

**Untersuchung zum Einfluß
von Translationsfaktoren auf die Transkription
von DNS in Escherichia coli**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Norbert Ulbrich
Berlin

1976

**Untersuchung zum Einfluß
von Translationsfaktoren auf die Transkription
von DNS in Escherichia coli**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Norbert Ulbrich
Berlin



- 1.Referent: Prof.Dr.Lochmann
- 2.Referent: Priv.-Doz.Dr.Pongs

Tag der mündlichen Prüfung : 10.März 1976

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Experimenteller Teil	3
2.1. Herkunft der Substanzen	3
2.2. Abkürzungen	6
2.3. Puffer	8
2.4. Isolierung von Ribosomen	8
2.5. Gewaschene 70S-Ribosomen	9
2.6. Darstellung von ribosomalen 30S- und 50S - Untereinheiten	10
2.7. Darstellung von ribosomalen Initiationsfaktoren	11
2.8. Anreicherung von Initiationsfaktor IF-2	12
2.9. Präparation von S100	14
2.10. Darstellung von Hefe Aminoacyl- tRNA-Synthetase	15
2.11. Präparation von Aminoacyl- Synthetase-Transformylase-Enzymen für die fMet-trNS ^{Met} _f -Darstellung	16
2.12. Darstellung von 10-Formyltetra- hydrofolat	17
2.13. Darstellung von fMet-trNS ^{Met} _f	18
2.14. Aminoacylierung von phe-trNS ^{phe} _y	20
2.15. Präparation der DNS-abhängigen RNS-Polymerase	20
2.16. Darstellung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase über DNS-Agarose Chromatographie	24
2.17. Darstellung von Chromosomen aus <u>Escherichia coli</u>	26

	Seite
2.18. Präparation von λ plac5DNS	27
2.19. Darstellung des Rohextraktes für die "zellfreie" Synthese von β -Galaktosidase	30
2.20. Jodierung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase	32
2.21. Bromacythilierung von (^{35}S)Met-tRNS _f ^{Met}	33
2.22. Isolation von Deoxyribonucleinsäure aus <u>Escherichia coli</u>	34
2.23. Proteinextraktionen aus Ribosomen	36
2.24. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.25. Elektrophorese ribosomaler Proteine in Polyacrylamid-Natriumdodecylsulfat-Gelen	39
2.26. Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamid-N-Lauroyl-Sarkosin-Gelen	41
2.27. Auswertung der Polyacrylamid-Natriumdodecylsulfat- und N-Lauroyl-Sarkosin-Gele	42
2.28. Vorbereitung der Proben	43
2.29. Lösungen für die Herstellung der Gelplatten	43
2.30. Polyuridylsäure-abhängige Polyphenylalanin-Synthese	44
2.31. Initiationskomplexbildung	46
2.32. Deoxyribonukleinsäure-abhängige Ribonukleinsäure-Polymerase-Reaktion	48
2.33. Zellfreie Synthese von β -Galaktosidase	49
2.34. Bestimmung der ATP- und GTP-Hydrolyse	52

3.	Resultate	54
3.1.	Assoziation von nicht-ribosomalen Proteinen mit Ribosomen	54
3.2.	Wechselwirkung zwischen Initiator-tRNS und RNS-Polymerase	65
3.2.1.	fMet-tRNS ^{Met} _f -Bindung an RNS-Polymerase	65
3.2.2.	Vergleichende Polyacrylamidgel-analyse von RNS-Polymerase- und von IF-2-Präparationen	69
3.2.3.	Immunologische Kreuzreaktion zwischen RNS-Polymerase und IF-2-Präparationen	72
3.2.4.	Affinitätsmarkierung von RNS-Polymerase mit bromacetilierter Met-tRNS ^{Met} _f	74
3.3.	Einfluß von Initiator-tRNS auf die DNS-abhängige <u>in vitro</u> Synthese von β -Galaktosidase	76
3.4.	Bindung von Initiator tRNS an <u>E. coli</u> Chromosomen	78
3.5.	Einfluß von Initiator tRNS auf die Transkription von λ DNS und <u>Escherichia coli</u> Chromosomen	85
4.	Diskussion	91
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literatur	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549013_0022

1. EINLEITUNG

Synthese und Struktur von Proteinen in Bakterien unterliegen einer genetischen Kontrolle. Die molekulare Organisation der Proteine ist in Strukturgenen festgelegt. Die Regulation dieser Strukturgene hängt von funktionell spezialisierten Regulator- und Operatorgenen ab, deren Aktivität über Repressoren kontrolliert wird. Inaktivierung von Repressoren durch spezifische Metaboliten induziert die Transkription (1,2) und Aktivierung von Repressoren inhibiert die Transkription entsprechender Gene (3,4,5). Daß Kataboliten die Synthese von Enzymen hemmen, wurde zuerst bei der Synthese von β -Galaktosidase in E. coli beobachtet (6). Neuere Ergebnisse haben gezeigt, daß die katabolische Repression der β -Galaktosidase-Synthese letztendlich darauf beruht, daß die Bindung der RNS-Polymerase an den zugehörigen Promotor inhibiert wird (7,8,9). Auch die Synthese stabiler RNS (r-RNS) in E. coli ist genetisch kontrolliert, wobei eine starke Koppelung zwischen der Transkriptionsrate der r-RNS Gene und der r-Protein Gene besteht (10). Die Syntheserate der r-RNS wird durch Bindung des Translationsfaktors EF-T an RNS-Polymerase stimuliert (11). Genetische Untersuchungen mit dem Phagen λ rif^d18 haben andererseits gezeigt, daß die Strukturgene für die Untereinheiten

der RNS-Polymerase mit den Strukturgenen für ribosomale Proteine benachbart sind (12). Weiterhin wurde gefunden, daß eine Mutation in einem Strukturgen eines ribosomalen Proteins die Eigenschaften von RNS-Polymerase beeinflußt (13).

Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Transkription von Genen durch RNS-Polymerase nicht nur durch Metaboliten reguliert wird, sondern auch durch Proteine des zellulären Translationsapparates. Diese Hypothese diene als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit, in der der Versuch unternommen wird, in vitro einen Einfluß der Translationsebene auf die Aktivität von RNS-Polymerase zu zeigen.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. Herkunft der Substanzen

RNase A (Boehringer, Mannheim)

DNase I (Serva, Heidelberg)

Lysozym (Boehringer, Mannheim)

tRNA_f^{Met}, N-formyl-methioninspezifisch aus E. coli MRE 600
(RNase-negativ) (Boehringer, Mannheim)

tRNA^{Phe}, phenylalaninspezifisch (Boehringer, Mannheim)

tRNA^{Met}, Methioninspezifisch (Boehringer, Mannheim)

Polyuridylsäure (lyophilisiertes Kaliumsalz) 2.2 µMol/mg
(Boehringer, Mannheim)

ATP (Boehringer, Mannheim)

GTP (Boehringer, Mannheim)

CTP (Boehringer, Mannheim)

UTP (Boehringer, Mannheim)

Folinsäure (Ca-Salz) (Serva, Heidelberg)

Dithiothreitol (Aldrich Chemical Company, Inc.,
Steinheim/Albuch)

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (Merck, Darmstadt)

Bentonit-SF (Aluminiumsilikat des Montmorillonit-
typs) (Serva, Heidelberg)

N,N'-Methylenbisacrylamid (Aldrich Chemical Com-
pany, Inc., Steinheim/Albuch)

N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (Fluka AG, Buchs,
Schweiz)

N-Lauroylsarkosin (Na-Salz) (Serva, Heidelberg)

Natriumdodecylsulfat (Serva, Heidelberg)

Triton X-100 (n=10) (Serva, Heidelberg)

Soluene-100 (Packard Instruments, Frankfurt/M.)

Coomassie Brilliant Blau R-250 (Serva, Heidelberg)

Brom(2-¹⁴C) Essigsäure 52 mCi/mMol (Amersham

Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig)

L-(Methyl-³H)Methionin 7.4 Ci/mMol, wässrige Lösung

enthält 0.2% 2-Mercaptoäthanol (Amersham Buchler

GmbH & Co KG, Braunschweig)

L-Phenylalanin-(¹⁴C)(U) 0.46 Ci/mMol in 1N HCl

L-(³⁵S)Methionin 240 Ci/mMol, wässrige Lösung ent-

hält 0.1% 2-Mercaptoäthanol (Amersham Buchler GmbH

& Co KG, Braunschweig)

(Methyl-³H)Thymin 20 Ci/mMol (Amersham Buchler GmbH

& Co KG, Braunschweig)

Guanosin(8-³H)5'-Triphosphat (Ammoniumsalz) in

Äthanol:Wasser (1:1 v/v) 15 Ci/mMol (Amersham Buchler

GmbH & Co KG, Braunschweig)

Guanosin-5'-Triphosphat- γ -³²P (Natriumsalz) 1.24 Ci/
mMol (Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig)

Adenosin-5'-Triphosphat- γ -³²P (Natriumsalz) 2.036

Ci/mMol (Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig)

Uridin(5,6-³H)5'-Triphosphat (Ammoniumsalz) in

Äthanol:Wasser (1:1 v/v) 49 Ci/mMol (Amersham Buchler

GmbH & Co KG, Braunschweig)

Adenosin(8-¹⁴C)5'-Triphosphat (Ammoniumsalz) 58 mCi/
mMol (Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig)

Servacel DEAE 23 SH-Cellulose (Serva, Heidelberg)
Sephadex G-50 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Bacto-Agar, Bacto-Tryptone, Bacto-Yeast-Extrakt
(Difco Laboratories, Detroit, Mich., U.S.A.)
Aluminiumoxid (Alcoa 301) (Aluminium Company of
America, Pittsburgh, Pa., U.S.A.)
Agarose (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
DNS (Kalbstymus) (Boehringer, Mannheim)
N-Succinimidy 3-(4 Hydroxyphenyl)propionat A grade
(Calbiochem, San Diego, Calif., U.S.A.)
p-Toluolsulfonchloramid-Natrium (Chloramin T)
(Merck, Darmstadt)
 ^{125}J (Natriumsalz) in NaOH Lösung pH 8-11 100 mCi/ml
(Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig)
Spermidin (Serva, Heidelberg)
Cytochrome C (Boehringer, Mannheim)
Eialbumin (Boehringer, Mannheim)
Rinderserumalbumin (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.)
N.N'-Diallyltartardiamid (EGA-Chemie KG, Steinheim/
Albuch)
Dimethylsulphoxid (Merck, Darmstadt)
Isopropylthiogalaktosid (Sigma, St. Louis, Mo.,
U.S.A.)
Orthonitrophenylgalaktosid (Serva, Heidelberg)
Aminosäuren (Calbiochem, San Diego, Calif., U.S.A.)

2.2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
RNS	-	Ribonukleinsäure
r-RNS	-	ribosomale Ribonukleinsäure
t-RNS	-	transfer (lösliche) Ribonukleinsäure
m-RNS	-	messenger (boten) Ribonukleinsäure
5'-XTP	-	Ribonukleosid-5'-triphosphat (X = A,C,G,U)
A	-	Adenin
G	-	Guanin
T	-	Thymidin
C	-	Cytosin
U	-	Uracil
EF-G	-	Elongationsfaktor G
EF-Tu	-	Elongationsfaktor Tu
c.p.m.	-	Impulse pro Minute (counts per minute)
U.p.m.	-	Umdrehungen pro Minute
S-Wert	-	Sedimentationskoeffizient (Svedbergeinheiten)
GTPase	-	GTP-phosphohydrolase
ATPase	-	ATP-phosphohydrolase
DNase	-	Desoxyribonuklease
DNS	-	Desoxyribonukleinsäure
M	-	Molar
EDTA	-	Äthylendiamin-tetra-acetat

Tris	- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (2-Amoni-2-hydroxy-methylpropan 1,3-diol)
fMet	- Formylmethionin
t-RNS ^{Met_f}	- Formylmethionin-spezifische t-RNS
t-RNS ^{Met_m}	- Methionin-spezifische t-RNS
t-RNS ^{phe}	- Phenylalanin-spezifische t-RNS
ppGpp	- Guanosintetraphosphat
S1	- Protein der kleinen ribosomalen Unter- einheit
A _x	- Absorption bei Wellenlänge x
S.T.E.	- Synthethase-Transformylase -Enzyme
PEP	- Phosphoenolpyruvat
TCA	- Trichloressigsäure
IF	- Initiationsfaktor
S30	- Überstand nach einer Zentrifugation mit 30 000 g, er enthält Ribosomen, aber keine Zelltrümmer
S100	- Ribosomen-freier Überstand nach einer Zentrifugation mit 100 000 g
IPTG	- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
λ plac5 DNS	- Desoxyribonukleinsäure eines Lamnda- phagen, der das Laktose-Operon enthält

2.3. Puffer

TMA I - Puffer: 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4)
 10 mM MgCl_2
 30 mM NH_4Cl
 6 mM 2-Mercaptoäthanol

TMA II - Puffer: 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.4)
 0.3 mM MgCl_2
 30 mM NH_4Cl
 6 mM 2-Mercaptoäthanol

2.4. Isolierung von Ribosomen (13a)

Escherichia coli A19 (RNase I^- , Met^-)(₁₄) wurde in Vollmedium gezüchtet und in der frühen logarithmischen Wachstumsphase (1×10^8 Zellen / ml Medium) geerntet. Die mit TMAI Puffer gewaschenen Zellen wurden bei -20°C gefroren aufbewahrt. In einem vorgekühlten Mörser wurden die gefrorenen Zellen zerstoßen und im angetauten Zustand mit der doppelten Menge an Aluminiumoxid (Alcoa-301), bezogen auf das Naßgewicht der Zellen, bei 0°C aufgeschlossen. Nach vollendetem Zellaufschluß wurde der entstandene Brei mit dem gleichen Volumen TMAI Puffer, in dem 1 μg DNase I/ml

gelöst war, verdünnt. Eine Zentrifugation in einem Sorvall-Rotor Typ SS36 bei 35 000 g, 4°C und 20 Min. Laufzeit ergab einen Überstand und ein Sediment. Das Sediment wurde darauf nochmals mit dem 1/2 Volumen an TMAI Puffer, der 1 µg DNase I/ml enthielt, homogenisiert und wieder unter gleichen Bedingungen einer zweiten Zentrifugation unterzogen. Die Überstände der ersten und zweiten Zentrifugation wurden vereinigt und nochmals unter identischen Bedingungen zentrifugiert. Aus dem klaren, gelbbraun gefärbten Überstand wurden die Ribosomen durch Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge (Beckman Spinco, 16 Std., 90 000 g, 4°C) als transparentes, schwach gelb gefärbtes Sediment angereichert. Das Sediment wurde in TMAI Puffer suspendiert und als ungewaschene 70S-Ribosomen bei -180°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Eine Konzentration von 500 - 1000_{A260} / ml war sinnvoll. Die Ausbeute lag bei 0,5 g Ribosomen pro 25 g Zellen.

2.5. Gewaschene 70S-Ribosomen

Ungewaschene Ribosomen wurden für 15 Std. bei 4°C - 8°C in TMAI Puffer, dessen Ammoniumchlorid-Konzentration 1 Molar war, aufbewahrt. Durch eine hochtourige Zentrifugation (Beckman Spinco, 16 Std.,

90 000 g, 4°C) wurden die Ribosomen als gewaschene Ribosomen sedimentiert und bei -180°C gelagert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde zur Präparation von Initiationsfaktoren verwendet.

2.6. Darstellung von ribosomalen 30S und 50S Untereinheiten

Die Trennung von 70S Ribosomen in die ribosomalen Untereinheiten von 30S und 50S wurde durch Zonalzentrifugation in einem Zonalrotor (Beckman Spinco Rotor 315) oder in einem Ausschwingrotor (Beckman Spinco SW27 oder SW41) in einem linearen Saccharose-Gradienten erzielt. Die Saccharose war 10 bzw. 30 gew. %ig in TMAII Puffer gelöst, und die Lösung wurde mit Bentonit - SF (Montmorillonit) versetzt, um eventuelle RNase-Spuren zu beseitigen. Nach 1 Std. bei 4°C wurde die Lösung für 20 Min. bei 10 000 U_{pm} in einem Sorvall-Rotor Typ SS36 bzw. GSA von Bentonite gereinigt. Die Saccharose-Gradienten in Nitrozelluloseröhrchen wurden mit Ribosomen überschichtet, die vorher 4 Std. gegen TMAII in der Kälte dialysiert wurden, und bei 4°C zentrifugiert (Beckman Spinco SW27, 35 ml Gradient, 250_{A260} Ribosomen, Laufzeit 4 Std., Umdrehung 25 000, oder im SW 41 Rotor, 12 ml Gradient, 3-5_{A260} Ribosomen,

3,5 Std. Laufzeit bei einer Umdrehung von 39 000). Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen mit einer Nadel in einer Halterung am Boden angestochen und Fraktionen (SW27 à 1,3 ml, SW41 à 0,5 ml) gesammelt. Von Verdünnungen aliquoter Teile der Fraktionen wurde die UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Als die Proben radioaktiv markiert waren, wurden aliquote Teile in 10 ml Bray's Szintillationscocktail pipettiert und im Szintillationszähler deren Radioaktivität bestimmt. Die Fraktionen, die eine brauchbare UV-Absorption bei A_{260} , für die 30S und 50S ribosomalen Untereinheiten zeigten, wurden durch Zentrifugation (Beckmann, Spinco 60 Ti Rotor, 30 Std., 150 000 g, 4°C) wieder konzentriert. Die nahezu farblosen Sedimente wurden in TMAI Puffer so resuspendiert, daß sich eine Konzentration um $1500_{A_{260}}$ / ml ergab. Die Suspension dieser Partikel wurde in Portionen von 100 µl in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und jeweils erst kurz vor Gebrauch wieder aufgetaut.

2.7. Darstellung von ribosomalen Initiations- faktoren (15)

Alle Isolationen und nachfolgenden Reinigungsschritte wurden in der Kälte ausgeführt. Der Über-

stand, der beim Waschen von 70S-Ribosomen mit 1 M Ammoniumchlorid anfiel, wurde mit Ammoniumsulfat (70% Sättigung, 472 g Ammoniumsulfat pro 1 Liter Lösung) gefällt, über Nacht bei 4°C stehengelassen und anschließend zentrifugiert (Sorvall, 20 Min. bei 30 000 g, 4°C). Das Sediment wurde in TMAI Puffer aufgenommen und gegen diesen Puffer, der aber eine Ammoniumchlorid-Konzentration von 0,28 Molar enthielt, dialysiert. Das Dialysat wurde dann über eine DEAE-Cellulose-Säule (2 x 15 cm), die mit demselben Puffer äquilibriert war, fraktioniert. Fraktionen, die ein Verhältnis von $A_{280} / A_{260} > 1$ hatten, wurden gesammelt und in 100 µl - Portionen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dieses Proteingemisch enthielt alle drei Initiationsfaktoren (IF-1, IF-2, IF-3) sowie auch ribosomale Proteine und wurde im folgenden mit IF bezeichnet.

2.8. Anreicherung und Reinigung von Initiationsfaktor IF-2 (15)

IF-2 wurde durch Säulenchromatographie auf DEAE-SH-Cellulose und Phosphocellulose gereinigt. Die 70S Ribosomen einer Präparation aus 500 g E. coli A19 Zellen wurden mit 200 ml 1 M NH_4Cl , 50 mM NaCl, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 10 mM Magnesiumacetat

und 0,1 M Tris HCl Puffer (pH 7.7) etwa 15 Std. bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Ribosomen abzentrifugiert (Beckman, Spinco R60 Ti, 4 Std., 150 000 g, 4°C). Das Sediment wurde als gewaschene Ribosomen verwendet. Nun wurde dem Überstand bis zu einer Sättigung von 30% (176 g auf 1 l) Ammoniumsulfat hinzugefügt. Das Sediment der Ammoniumsulfat-Füllung wurde verworfen und im Überstand die Ammoniumsulfat-Konzentration auf 75% Sättigung (561 g auf 1 l) erhöht. Das Sediment dieser zweiten Füllung wurde in 70 ml, 25 mM Ammoniumchlorid, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 5% Glycerin (v/v), 10 mM Tris HCl (pH 7.7) (Puffer I) aufgelöst gegen Puffer I dialysiert, auf eine DEAE-Cellulose-Säule (45 x 3,4 cm) aufgetragen und mit 500 ml dieses Puffers nachgewaschen. Anschließend wurde die Säule mit einem Gradienten (0,1 - 0,35 M Ammoniumchlorid in Puffer I, 1,5 l, 10 ml / Fraktion bei 4°C) eluiert. Die Fraktionen 136-160, die die Hauptmenge der IF-2 Aktivität enthielten, wurden nach einer Ammoniumsulfat-Füllung bei 35% Sättigung gesammelt. Der Niederschlag wurde in 10 ml, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 0,5 mM EDTA, 10% Glycerin (v/v), 20 mM Tris HCl (pH 7.7) (Puffer II) aufgelöst und gegen denselben Puffer dialysiert. Die klare Lösung wurde auf eine Phosphocellulose-Säule (2 x 50 cm), die mit Puffer II äquilibriert war, aufgetragen und mit 50 ml Puffer, der zusätzlich 0,1 M Ammoniumchlorid enthielt, nachgewaschen. Eluiert

wurde die Säule mit einem linearen Salz-Gradienten (0,15 - 0,4 M Ammoniumchlorid in Puffer II, 500 ml, 10 ml pro Fraktion bei 4°C). Die Fraktionen (Nr. 19-30), die IF-2 Aktivität zeigten, wurden durch Ultrafiltration (Amicon Model 202, Filter PM 30) konzentriert und in kleinen Portionen (100 µl) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.9. Präparation von S100 (16)

Der bei der Ribosomenpräparation nach der Ultrazentrifugation anfallende Überstand, der alle löslichen Enzyme der Zelle enthält, diente zur Isolierung eines Enzymgemisches, das frei von Nukleinsäuren und deren Bruchstücken war. Dieser Überstand wurde in 10 mM $MgCl_2$, 30 mM NH_4Cl , 1 mM 2-Mercaptoäthanol, 10 mM Tris HCl (pH 7.5) auf das doppelte Volumen verdünnt und mit DEAE-Cellulose, die mit demselben Puffer äquilibriert war, verrührt und bei 4°C für eine Std. stehengelassen. Für ein Extrakt aus 10 g Zellen wurden 5 g DEAE-Cellulose eingesetzt. Auf einer Glasfritte (G2) wurde die DEAE-Cellulose-Aufschlammung so lange mit dem beschriebenen Puffer gewaschen, bis nur noch unwesentliche Mengen des bei 260 nm absorbierenden Nukleinsäureanteils herausgewaschen werden konnten. Danach wurde die Ammoniumchlorid-Konzentration des oben beschriebenen Puffers auf

0,25 M Ammoniumchlorid erhöht und damit die Proteine von der DEAE-Cellulose-Säule eluiert. Die Proteinkonzentration der gesammelten Fraktionen betrug 8 - 10 mg/ml. Diese Rohenzymfraktion enthielt alle Enzyme, die für die Polyuridylsäure-abhängige Polyphenylalanin-Synthese notwendig waren.

2.10. Darstellung von Hefe Aminoacyl-tRNA Synthetase (17)

Eine grobe Hefe Aminoacyl-tRNA Synthetase-Präparation lief nach folgendem Schema ab. 10 g Bäckerhefe wurden in 10 ml Puffer gelöst (50 mM Tris HCl (pH 7.8), 10 mM Magnesiumacetat und 10 mM 2-Mercaptoäthanol). Die Zellen wurden dann mit 40 g säuregewaschenen Glasperlen in einem Homogenisator gemahlen. Das Homogenat wurde bei 30 000 Upm für 3 Std. zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (1,5 x 14 cm), die mit 10 mM Magnesiumacetat, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 60 mM KCl und 50 mM Tris HCl Puffer (pH 7.8) äquilibriert war, aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer (50 mM Tris HCl pH 7.8, 10 mM Magnesiumacetat, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 150 mM NaCl und 60 mM KCl gewaschen, und die ersten 120 ml der Fraktionen wurden gesammelt und festes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 0,85 M hinzugegeben. Das Präzipitat wurde durch

eine niedrigtourige Zentrifugation sedimentiert und in einem kleinen Volumen Puffer (30 mM Tris HCl, pH 7.8; 10 mM Magnesiumacetat, 6 mM 2-Mercaptoäthanol und 60 mM KCl) aufgenommen und gegen denselben Puffer für 18 Std. in der Kälte dialysiert. Das Dialysat wurde mit einem gleichen Volumen Glycerin vermenget und bei -20°C gelagert. Diese Zellfraktion enthielt Phenyl-Synthetase-Aktivität und wurde zur enzymatischen Darstellung von $\text{phe-tRNS}^{\text{phe}}$ aus tRNS^{phe} verwendet.

2.11. Präparation von Aminoacyl-Synthetase-Trans-
formylase-Enzymen für die $\text{fMet-tRNS}^{\text{Met}}$ -
Darstellung (15)

10 g gefrorene E. coli A19 Zellen, geerntet in der logarithmischen Wachstumsphase, wurden mit 20 g Aluminiumoxid (Alcoa 301) in einem vorgekühlten Porzellanmörser so lange zerrieben, bis sich ein homogener Brei gebildet hatte. Dieser Brei wurde mit 10 mM Magnesiumacetat, 30 mM Ammoniumchlorid, 10 mM 2-Mercaptoäthanol, 0,5 EDTA, 20 mM Tris HCl Puffer (pH 7.8) verdünnt. Nach zweimaliger niedrigtouriger Zentrifugation (Sorvall SS36, 20 Min., 30 000 g, 4°C) wurde dem Überstand 50 μg DNase I hinzugegeben und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abtrennung der Ribosomen durch eine hochtourige Zentrifugation (Beckman Spinco R60 Ti, 2 Std., 150 000 g,

4°C) wurde das Volumen des Überstandes durch Zugabe von 0,5 M Kaliumphosphat Puffer (pH 7.5) verdoppelt. Die Lösung wurde, um Nukleinsäuren und deren Bruchstücke zu entfernen, auf eine DEAE-Cellulose-Säule (15 x 2 cm) aufgetragen. Die DEAE-Cellulose war mit 1 mM Magnesiumacetat, 10 mM 2-Mercaptoäthanol, 0,1 mM EDTA, 0,25 Kaliumphosphat Puffer (pH 7.5) äquilibriert. Die nicht auf der Säule zurückgehaltenen Proteine wurden mit Ammoniumsulfat (75% Sättigung, 516 g Ammoniumsulfat pro Liter Eluat) ausgefällt und als Niederschlag abzentrifugiert. Nach dem Auflösen in 1 mM Dithiotreitol, 0,5 mM EDTA, 10% Glycerin, 50 mM Tris HCl Puffer (pH 7.8) wurde die Lösung gegen denselben Puffer dialysiert und in 0,5 ml Portionen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Diese Zellfraktion enthielt Methionyl-Synthetase und Transformylase-Aktivität und wurde zur enzymatischen Darstellung von fMet-tRNS_F^M aus tRNS_F^M bzw. von Met-tRNS^M aus tRNS_m^M verwendet.

2.12. Darstellung von 10-Formyltetrahydrofolat (15)

Der Lösung von 25 mg (41,5 µMol) Folinsäure (Ca-Salz) in 2 ml 50 mM 2-Mercaptoäthanol wurden 220 µl (220 µMol) 1 N HCl hinzugegeben und ausgefallene Substanzen durch leichtes Erwärmen wieder in Lösung gebracht. Nach 3 Std. bei Raumtemperatur war die Cyclisierung zu N⁵, N¹⁰ Methenyltetrahydro-

folat ($d_{\max} = 355 \text{ nm}$) vollständig abgelaufen. (Folinsäure hat bei 282 nm ein Maximum der UV-Absorption.) Die Konzentration der Lösung wurde durch Verdünnen mit 0,1 N HCl auf 15 mM Formyl donor ($1 \mu\text{l} \hat{=} 15 \text{ nMol}$) eingestellt. 100 μl Portionen dieser Lösung wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurden 150 nMol Formyl donor durch Zugabe von 10 μMol Tris HCl Puffer (pH 7.8), 10 μMol KOH und Stehenlassen für 15 Min. bei Raumtemperatur in 10-Formyltetrahydrofolat umgewandelt.

2.13. Darstellung von fMet-tRNS_f^{Met} (18)

<u>10 ml Reaktionsgemisch enthalten</u>		<u>Endkonzentration</u>	
500	μMol Tris HCl Puffer pH 7.4	50	mM
120	μMol MgCl_2	12	mM
100	μMol KCl	10	mM
30	μMol 2-Mercaptoäthanol	3	mM
75	μMol ATP	75	mM
0,2	μMol [^3H] Methionin (7,4 Ci/mMol)	20	mM
100	μMol tRNS _F ^{Met} (<u>E. coli</u>)	10	mM
6	μMol 10-Formyltetrahydrofolat	0,6	mM
5	mg Synthetase-Transformylase- Präparation	0,5	mg/ml

Das Enzym wurde dem Gemisch als letzte Substanz hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von 20 Min. bei 37°C wurde 1,1 ml 2 M Kaliumacetat Puffer (pH 6.0) hinzugefügt, um die Reaktion abzustoppen und mit 10 ml Phenol, das mit Kaliumacetat Puffer (pH 6.0) gesättigt war, ausgeschüttelt. Durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (10 Min., 3000 Upm) trennte sich das 2-Phasensystem in zwei Schichten. Die wässrige Schicht (oben), in der die t-RNS enthalten war, wurde mit einer Spitze abgesaugt, mit zwei Volumina absolutem Äthanol versetzt und 2 Std. bei -20°C stehengelassen. Die flockig ausgefallene tRNS wurde durch niedrigtourige Zentrifugation isoliert und in 1 ml 2 mM Kaliumacetat Puffer (pH 6.0), der 1 mM MgCl₂ enthielt, aufgelöst. Säulenchromatographie über Sephadex G-50 (2 x 20 cm) ermöglichte eine Abtrennung des Überschusses sowie eine Reinigung vom noch enthaltenen Phenol der wässrigen Phase, welches auch durch Alkohol in der Kälte präzipitierte. 5 - 10 µl je Fraktion (eine Fraktion = 1,5 - 2 ml) wurden in Szintillationsgläsern mit je 10 ml Bray's Szintillationscocktail versetzt, um die Radioaktivität zu bestimmen. Die radioaktiven Bande im Ausschlußvolumen des Säulenbettes wurde gesammelt und gefriergetrocknet. Die so erhaltene fMet-tRNS_f^{Met} wurde in 1 - 2 ml Wasser aufgelöst und in Portionen von 100 µl in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Darstellung der Met-tRNS_m^{Met} lief nach dem identischen Schema ab,

nur mit der Ausnahme, daß im Inkubationsgemisch der Formyldonor ausgelassen wurde.

2.14. Aminoacylierung von tRNA^{phe}_y (17)

<u>1 ml Reaktionsgemisch enthalten</u>	<u>Endkonzentration</u>
100 µMol Tris HCl Puffer (pH 7.5)	10 mM
10 µMol Mgac ₂	1 mM
10 µMol KCl	1 mM
2 µMol ATP	0,2 mM
0,1 - 0,2 µg Ci [¹⁴ C] Phenylalanin (20 - 200 µ Ci/µmole)	
300 µg Aminoacylsynthetase Hefe	
3 µMol 2-Mercaptoäthanol	0,3 mM

Nach einer Reaktionszeit von 30 Min. bei 30°C wurde mit 1,1 ml 2 M Kaliumacetat Puffer (pH 6.0) die Reaktion abgestoppt. Die weitere Darstellung lief identisch ab, wie sie für die Präparation der fMet-tRNA^{Met}_f kurz vorher beschrieben wurde.

2.15. Präparation der DNS-abhängigen RNS-Polymerase (19)

E. coli K12 wurde in einem Vollmedium, welches pro Liter 16 g Difco-Bacto-Tryptone, 10 g Difco Yeast Ex-

trakt, und 5 g NaCl enthielt, bis in die logarithmische Wachstumsphase bei 37°C Aufzuchttemperatur gezogen und mit einer gekühlten Durchlaufzentrifuge abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden ohne nachträglich gewaschen zu werden bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren. Zur Präparation der RNS-Polymerase wurden 500 g Zellen in 500 ml 10 mM MgCl₂, 200 mM KCl, 0,1 mM DTT, 0,1 mM EDTA 5% (v/v) Glycerin, 50 mM Tris HCl Puffer, pH 7.5, suspendiert. DNase I wurde zu einer Konzentration von 1 mg/100 ml hinzugesetzt und die Zellen mit einer French-Press geöffnet. Diese und sämtliche anderen Behandlungen fanden bei 4°C statt. Der Zellsaft wurde über Nacht in einem Sorvall Rotor Typ IIB-4 12 Std. lang mit 9500 Upm (14600g) bei 4°C von Membranen und anderen Zelltrümmern befreit. Zu dem so präparierten Überstand wurden pro 100 ml 23,1 g festes Ammoniumsulfat hinzugegeben, so daß die 33% Ammoniumsulfat-Sättigung eintrat. Während der Zugabe wurde darauf geachtet, daß der pH nicht unter 7 absank. Korrigiert wurde mit 1 M NaOH. Nachdem die Lösung 30 Min. gerührt hatte, wurde das Präzipitat durch eine niedrigtourige Zentrifugation (Sorvall 9 000 Upm $\hat{=}$ 14 000 g, 30 Min., 4°C) sedimentiert. Dieses Sediment wurde verworfen und zum Überstand wurde pro 100 ml zusätzlich 10,75 g festes Ammoniumsulfat gegeben, so daß der Überstand zu 50% mit Ammoniumsulfat gesättigt wurde. Bei dieser letzten Ammoniumsulfatzugabe mußte

auf den pH-Wert geachtet werden, und - falls er unter pH 7 sank - mit 1 N NaOH korrigiert werden. Die Lösung rührte 14 Std. in der Kälte. Das entstandene Präzipitat enthielt RNS-Polymerase und wurde nach einer niedrigtourigen Zwischenzentrifugation, wie vorher beschrieben, in 42%igem Ammoniumsulfat (255 g auf 1 l) aufgenommen, welches in einem 10 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin, 10 mM Tris HCl Puffer (pH 7.9) gelöst war. Dieses Resuspendat rührte 45 Min. und wurde dann 45 Min. bei 9000 Upm in einer gekühlten Sorvall-zentrifuge im Rotortyp SS36 zentrifugiert. Das Pellet enthielt das Enzym und wurde in dem vorher beschriebenen Tris HCl Puffer (pH 7.9) bis zu einer spezifischen Leitfähigkeit von 10 mS pro cm bei 4°C verdünnt. Diese Leitfähigkeit entsprach dem Tris HCl Puffer, pH 7.9, mit 130 mM KCl. Für die weitere Reinigung wurde die Polymerase auf eine DEAE-Cellulose-Säule (21 x 2,8 cm), die mit Tris·HCl Puffer pH 7.9 äquilibriert war, aufgetragen und mit 700 ml des Tris·HCl Puffers pH 7.9 nachgewaschen, danach wurden 300 ml Tris·HCl Puffer pH 7.9 plus 130 mM KCl über die Säule gegeben und als letzter Schritt so lange ein 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin, 230 mM KCl Tris·HCl Puffer pH 7.9, bis kein UV-absorbierendes Material mehr nachgewiesen werden konnte. Die betreffenden Fraktionen mit Polymeraseaktivität wurden nach diesem Fraktionierungsschritt gesammelt und durch Zugabe von 1 1/2 Volumen an gesättigtem Ammoniumsulfat (767 g auf 1 l) gefüllt

und in einem möglichst geringem Volumen eines 10 mM MgCl_2 , 0,1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 5% (v/v) Glycerin Tris-HCl Puffer pH 7.9 resuspendiert und zweimal 2 Std. in der Kälte gegen das 100fache Volumen des gleichen Puffers dialysiert. Das dialysierte Protein wurde auf eine Konzentration von 20 mg/ml mit dem vorher beschriebenen Puffer verdünnt und auf einen 10 - 30% (v/v) Glyceringradienten in dem gleichen Puffer mit Ionenstärke von 0,04 gegeben. 1,5 ml wurden auf ein Spinco SW 25,1 Zentrifugenröhrchen gegeben und dann 24 Std. mit 25 000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Die Fraktionen mit Polymeraseaktivität wurden gesammelt, wieder mit dem 1 1/2 Volumen an gesättigtem Ammoniumsulfat gefüllt und in 10 mM MgCl_2 , 0,1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 5% (v/v) Glycerin, 1 M KCl Tris HCl-Puffer pH 7.9 aufgenommen und gegen diesen Puffer zweimal 2 Std. dialysiert. Das dialysierte Protein wurde auf einen 10 -30%igen Glyceringradienten, unter den vorher beschriebenen Pufferbedingungen mit 1 M KCl, aufgetragen und 30 Std. mit 25 000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Nach diesem letzten Reinigungsschritt wurden die Polymeraseaktivität zeigenden Fraktionen wieder in der beschriebenen Weise gefällt, in einem 10 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 0,1 mM Dithiothreitol, 50% (v/v) Glycerin, 10 mM Tris-HCl Puffer pH 7.9 gelöst und bei -20°C gelagert.

2.16. Darstellung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase
über DNS-Agarose Chromatographie (20)

Die Methode ähnelte der vorher beschriebenen bis einschließlich zur DEAE-Säulen-Chromatographie. 100 g E. coli K12 Zellen wurden in einem vorgekühlten Mörser angetaut und mit der doppelten Menge an Aluminiumoxid (Alcoa 301), bezogen auf das Gewicht der Zellen, bei 0°C zermahlen. Nach dem Mahlen wurden 300 ml eines 200 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 5% (v/v) Glycerin, 50 mM Tris·HCl Puffers pH 8.0 hinzugegeben. Zelltrümmer und Ribosomen wurden durch eine hochtourige Zentrifugation (50 000 Upm Spinco Ti 60, 3 Std., 4°C) entfernt. Die Proteine in klarem Überstand wurden durch eine 50%ige Ammoniumsulfat-präzipitation (313 g auf 1 l) gefällt und nach einer niedrigtourigen Zwischenzentrifugation in einem 0,1 mM Dithiothreitol, 5% (v/v) Glycerin, 10 mM Tris·HCl Puffer pH 7.5 aufgenommen. Diese Fraktion wurde so lange mit diesem Puffer verdünnt, bis seine Ionenstärke die gleiche Leitfähigkeit besaß wie dieser eben beschriebene Puffer plus 0,3 M KCl. Die Probe wurde dann über eine DEAE-Cellulose- Säule (5 x 20 cm), die mit 0,1 mM Dithiothreitol, 5% (v/v) Glycerin, 300 mM KCl, 10 mM Tris·HCl Puffer pH 7.5 äquilibriert war, gegeben. Das Durchflußmaterial mit einem 260/280 Absorptionsverhältnis $> 0,8$ wurde gesammelt und mit einer 66%igen Ammoniumsulfatkonzentration gefällt, zwischenzentrifugiert und in

10 mM Tris·HCl Puffer pH 7.5 plus 30% Glycerin gelöst. In diesem Puffer wurde die grobe RNA-Polymerase als DEAE·RNA-Polymerase·Präparation bis zur DNS-Agarosen-Säulen-Chromatographie bei -20°C gelagert. Zur Präparation der DNS-Agarose-Säulen wurden 15 mg Kalbthymus DNS pro ml 0,02 M NaOH gelöst und bei 50°C mit einem gleichen Volumen an 8% (v/v) Agarose-Lösung in einem vorgewärmten Wasserbad vermennt und sehr schnell auf einen eiskalten Glasteller gegossen. Das so erstarrte Agar·DNS Gel wurde in Stücke geschnitten und zweimal durch ein 60 mesh Stahlsieb gepreßt. Die so zerkleinerte DNS·Agarose wurde in einem 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 10 mM Tris·HCl Puffer suspendiert und, nachdem die Säule gegossen worden war, ausgiebig mit diesem Puffer gewaschen, bis keine DNS mehr durch das Absorptionsspektrum im Durchfluß nachgewiesen werden konnte. Während der Waschprozedur gingen ungefähr 25% der eingesetzten DNS verloren. Die zerkleinerte DNA·Agarose war in einem 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 10 mM Tris·HCl Puffer pH 7.5 und bei 4°C gelagert über Monate stabil. Die so präparierte DNS·Agarose-Säule (0,8 x 15 cm) wurde mit DEAE·RNS·Polymerase-Präparation beladen (ca. 10 mg), nachdem die Probe gegen den Säulenpuffer dialysiert war. Eluiert wurde die Säule mit einem linearen Salzgradienten (0,15 - 1,0 M KCl in 10 mM Tris·HCl Puffer pH 7.5, 0,1 mM Dithiothreitol, 5% (v/v) Glycerin, 5 - 6 ml pro Std., 2 ml pro Fraktion bei 4°C). Fraktionen wurden entsprechend

ihrer Polymeraseaktivität gesammelt und in beschriebener Art gefällt, in dem Säulenpuffer ohne KCl gelöst, mit 30% (v/v) Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

2.17. Darstellung von Chromosomen aus *Escherichia coli*
(21,22,23)

E. coli B 301 (Thy⁻, Arg⁻, Meth⁻, pro⁻, His⁻, leu⁻, Trp⁻, lac⁻) wurde in 80 ml Minimalmedium 008 (2 g NH₄Cl, 6 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 3 g KH₂PO₄, 3 g NaCl, 0,175 g MgSO₄ x 7 H₂O ad 1000 ml H₂O) versetzt mit 20 µg/ml jeder der fehlenden Aminosäure außer Thymin, 10 µg/ml Thymin, 160 mg/ml Glucose, 1% (v/v) Übernachtskultur von 301 und 200 µCi (³H) Thymin, bei 37°C in einem Brunswick Warmluftfermenter bis zu OD₆₀₀ = 0,5 aufgezogen. Die Zellen wurden darauf bei 4°C in einem Sorvall Rotor Typ SS34 bei 10 000 Upm für 10 Min. sedimentiert und in 0,5 ml einer Lösung (0,01 M Tris·HCl, pH 8.2, 0,1 M NaCl, 20% (v/v) Sucrose) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation mit Lysozym (0,1 m einer 8 mg/ml Lösung, 0,12 M Tris·HCl, pH 8.2 und 0,05 M Äthylendiamintetraacetat (EDTA) für 40 Sek. im Eisbad. Darauf wurden 0,5 ml einer Lösung hinzugegeben, die 1% Brij-58, 0,4% Deoxycholat. Na, pH 8.5, 0,01 M EDTA und 0,01 M Spermidin·HCl enthielt. Die Zellen lysierten 3 Min. bei 10°C. Nach der Lyse wurde das Lysat einer niedrigtourigen Zentrifugation unterworfen (Sorvall Rotor Typ SS34, 5700 Upm ☞

4000 g, 5 Min., 4°C), das Pellet verworfen und der zum größten Teil nicht viskose Überstand (1,2 ml) auf einen 10 - 30% Sucrosegradienten gegeben. Die Sucrose enthielt 1 mM 2-Mercaptoäthanol, 1 mM EDTA, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 10 mM-Tris HCl Puffer pH 8.2. Der Gradient befand sich in SW 50,1 Nitrozelluloseröhrchen, war vorgekühlt und hatte eine Gesamtlaufzeit von 12 Min. bei 9000 g $\hat{=}$ 10 000 Upm im SW 50,1 Rotor. Die Zentrifugenröhrchen wurden nach Beendigung des Laufes in eine Halterung gespannt, oben durch einen Korken mit einem kleinen Loch verschlossen zur Regulierung der Ausfluggeschwindigkeit und unten mit einer Kanüle angestochen. Fraktionen von 3 Tropfen (ca. 90 μ l) wurden in 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen gesammelt und Aliquots zur Radioaktivitätsbestimmung abgenommen. Die Fraktion mit dem besten (³H)Thymineinbau wurde für die nachfolgenden funktionellen Tests benutzt. Die so präparierte DNS war nur 1 - 2 Std. in diesem nicht viskosen "supercoiled" Zustand stabil. Somit sollte die Präparationsdauer von der Lyse bis zum Test so eng wie möglich gefaßt sein.

2.18. Präparation von λ plac5DNS (24)

Die DNS wurde von einem E. coli Stamm präpariert. Die Zellen wuchsen in einem Medium, das pro Liter destillierten Wassers 5 g NaCl, 10 g Bacto-

tryptone , 5 g Yeast Extrakt enthielt. Ausgehend von einer sauberen Stammkultur wurde eine 100 ml Übernachtskultur bei 38°C gestartet. Diese 100 ml Kultur wurde benützt, um eine 5 Liter Kultur für weiteres Wachstum bei 33°C zu inoculieren. Bei einem OD-Wert von 0,6_{A260} nach ungefähr 3 Std. wurde die Temperatur in einem vorgeheizten Wasserbad auf 44°C erhöht. Die Zellen wuchsen dann 6 Std. bei 37°C weiter. Sie wurden geerntet in einem Sorvall GSA Rotor bei 10 000 Upm $\hat{=}$ 16 300 g für 5 Min. Das Naßgewicht des Sediments betrug aus einer 5 Literkultur 12 - 18 g. Das Zellsediment wurde in der Kälte in einem 0,5 M NaCl, 0,001 M EDTA, 0,1 M Tris·HCl Puffer pH 8.0 resuspendiert. Zu diesem Resuspendat wurde 30 µg/ml DNase 1 und 80 µg/ml Lysozym gegeben und bei 0°C/60 Min. lang inkubiert. Nach Beendigung dieser Inkubation wurde die Lösung auf 10 mM MgCl₂ ergänzt und einer zweiten Inkubation für 15 Min. bei 0°C unterworfen. Darauf wurde zur Lösung 1% Chloroform (v/v) gegeben. Die Lösung wurde kurz aufgewirbelt und dann in einem Sorvall GSA Rotor bei 10 000 Upm/10 Min. zentrifugiert. Im Sediment befanden sich nun die Zelltrümmer und die nicht lysierten Zellen, im Überstand die Phagen. Die Phagen wurden über Nacht in einem Sorvall GSA Rotor bei 8000 Upm (10 400 g) sedimentiert und konnten so am nächsten Morgen in einem Phagenpuffer (1 M NaCl, 1 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 0,25 mM EDTA und 0,01 M Tris·HCl pH 7.6) aufgenommen

werden. Über einen Cäsiumchlorid-Stufengradienten wurden die Phagen gereinigt und konzentriert. In Spinco SW41 Nitrozellulose tubes wurden die beladenen Gradienten bei 35 000 U μ m für 1,5 Std. in 15°C gefahren. Die Gradienten bestanden vom Boden aus gesehen aus vier Schichten. Die unterste Schicht bestand aus 1,5 ml einer Cäsiumchloridlösung, angesetzt, wie auch die folgenden Cäsiumchloridlösungen in einem 5 mM MgSO₄, 30 mM NaCl, 10 mM Tris·HCl Puffer pH 7.5, mit einem refraktometrischen Index von $n = 1,392$ und einer Dichte von 1,7. Die zweite Schicht hatte eine Dichte von 1,5, einen Index von $n = 1,380$ und ein Volumen von 2 ml. Die dritte Schicht bestand aus 2 ml einer Cäsiumchloridlösung mit der Dichte 1,3 und dem refraktometrischen Index von $n = 1,362$. Die vierte oberste Schicht hatte eine Dichte von 1,1, ein Volumen von 2 ml und einen refraktometrischen Index von $n = 1,338$. Nach Beendigung des Laufes, gestoppt wurde ohne Bremse, wurden die Zentrifugenröhren in eine Halterung gespannt und, nachdem sie oben mit einem Korken, durch den eine Kanüle führte, verschlossen waren, von unten mit einer Nadel angestochen. Auf diese Weise konnte die gut sichtbare, stark opalizierende Bande gesammelt werden. Durch die Nadel im Korken konnte die Tropfgeschwindigkeit durch einen leichten negativen Druck reguliert werden. Die gesammelte Phagenbande wurde über Nacht in der Kälte gegen das 150 xfache

Volumen an 10 mM Tris·HCl pH 8.0 dialysiert. Zum Dialysat wurde das gleiche Volumen 90%igen Phenols, angefärbt mit Hydroxychinolin, gegeben. Diese Lösung wurde äußerst vorsichtig ausgeschüttelt, und das Phenol wurde von der wässrigen Phase durch eine niedrigtourige Zentrifugation (5 Min., 2000 Upm $\hat{=}$ 3020 g, 25°C, Sorvall Rotor SS36) getrennt. Das Phenol wurde mit einer Pasteurpipette entfernt. Nach vier Extraktionen wurde die wässrige Phase mit einer weiten Pipette gesammelt und über Nacht gegen 10 mM Tris·HCl pH 7.8 im Kältelabor dialysiert. Die dialysierte DNS wurde bei 4 - 6°C aufbewahrt und war so über Nacht aktiv.

2.19. Darstellung des Rohextraktes für die
"zellfreie" Synthese von β -Galaktosidase
(25,26)

Die bakteriellen Zellen E. coli 514, die für die Darstellung des Rohextraktes (S-30) benutzt wurden, wuchsen bei 28°C in einem Vollmedium (pro Liter 5,6 KH_2DO_4 , 28,9 g K_2HPO_4 , 10 g Yeast Extrakt Difco, 10 mg Thiamin und 40 ml 25%ige Glucose) bis zur mitlogarithmischen Wachstumsphase. Zur Aufzucht wurde ein New Brunswick Microfarm Fermentor benutzt. Das Medium wurde mit 10% Übernachtskultur angeimpft und bei 7,0 OD₅₄₆ mit einer Kühlschlange

schnell abgekühlt. Die Bakterien wurden mit einer Durchlaufzentrifuge sedimentiert. Die Ausbeute betrug ungefähr 8 - 10 g Zellen im Feuchtgewicht pro Liter Medium. Das Sediment wurde zweimal mit einem Aufschlußpuffer (14 mM $MgCl_2$, 60 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol, 10 mM Tris·HCl pH 8.2) gewaschen und bis zum Aufschluß in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Zellaufschluß, für die Präparation des S-30 Extraktes, wurden die Zellen (50 g) langsam bei 4°C aufgetaut und in dem 1,3 fachen Volumen Aufschlußpuffer suspendiert. Das Resuspendat wurde in eine Aminco Preßzelle gefüllt, und die Zellen wurden mit einem Druck von 6 000 - 8 000 psi lysiert. Sofort nach Lyse wurde dem Lysat 1 pmol Dithiothreitol pro ml Lysat hinzugegeben. Nach zwei niedrigtourigen Zentrifugationen (Sorvall Rotor Typ SS34, 30 000 g, 20 Min., 4°C) wurde dem Überstand pro ml Folgendes hinzugefügt:

	<u>Endkonzentration</u> <u>(einschl. Aufschlußpuffer)</u>
100 µl 1 M Tris HCl pH 7.8	86,1 mM
20 µl 0,14 M $MgCl_2$	16,2 mM
40 µl 0,02 M ATP (neutralisiert mit KOH)	0,6 mM
120 µl 0,075 M Na_3 PEP (frische Lösung)	6,9 mM
10 µl 0,1 M Dithiothreitol	0,8 mM
20 µl 0,5 mM jede Aminosäure	8 µM
5 µl Pyruvat Kinase (10 mg/ml)	50 µg

Dieser Inkubationsansatz wurde bei 37°C für 80 Min. in einem leicht geschüttelten Gefäß inkubiert und darauf zweimal für 8 Std. bei 4°C gegen einen 0,014 M MgCl_2 , 0,06 M KAc, 0,001 M Dithiothreitol, 0,01 M Tris·HCl Puffer pH 8.2 dialysiert. Das Dialysat wurde in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und war über Monate hinweg stabil.

2.20. Iodierung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase (27)

Die Präparation des iodierten Hydroxyphenylpropionsäureesters fand bei Raumtemperatur (um 20°C) statt. Crystallines N-succinimidyl 3-(4-Hydroxyphenyl)propionat (0,2 - 0,25 μg , d.h. 1 μl aus einer Lösung 5 mg/20 ml in Dioxan) wurde mit Chloramin T (50 μg), d.h. 10 μl aus einer Lösung 5 mg/ml in 0,25 Natriumphosphat Puffer pH 7.5) als oxidierendes Agens und $\text{Na } ^{125}\text{J}$ (100 - 200 μCi , d.h. 1 - 3 μl aus einer Lösung von ca. 100 mCi/ml) versetzt. Die Reaktion wurde sofort durch die Zugabe von 120 μg Natriumdisulfit (10 μl aus einer Lösung 12 mg/ml in 0,05 M Natriumphosphat Puffer, pH 7.5) sowie durch Zugabe von 200 μg Natriumjodid (10 μl aus einer Lösung 20 mg/ml in 0,05 M Natriumphosphat Puffer, pH 7.5) gestoppt. Nach Zugabe von 5 μl Dimethylformamid, notwendig für die quantitative Extraktion des Ester in die Lösung, wurde das jodierte Produkt in zweimal 250 μl Benzol extrahiert. Das Benzol wurde darauf

durch Evaporation entfernt. Da der Hydroxysuccinimid Ester unter diesen Bedingungen der Jodierungsreaktion instabil ist, sollte diese Präparation in 30 Sek. durchgeführt worden sein. Der getrocknete jodierte Ester wurde mit 8 µg RNS-Polymerase (2 µl aus einer 4 mg/ml Lösung) und 10 µl eines 0,1 M Borat Puffers, pH 8.5, versetzt und bei 0°C für 15 Min. inkubiert. Das gesamte Inkubationsgemisch wurde dann auf eine Sephadex G-50 Säule (4 x 0,5 cm) aufgetragen, die mit einem 10 mM MgCl₂, 30 mM NH₄Cl, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, 10 mM Tris•HCl Puffer pH 7.8 äquilibriert war. Eluiert wurde die Säule mit dem Äquilibriersationspuffer (2 Tropfen pro Fraktion, d.h. 100 - 150 µl). Die jodierte Polymerase wurde unter diesen Bedingungen in den Fraktionen 3 - 6 nachgewiesen. Der RNS-Polymerase-Bereich wurde gesammelt und durch Gefrier-trocknen konzentriert. Nach Zugabe von 20 - 30 µl H₂O wurde die so jodierte Polymerase sofort für die anstehenden Tests, ohne sie einzufrieren, benutzt.

2.21. Bromacethylierung von (³⁵S)Met-tRNS_f^{Met}

Die Bromacethylierung einer tRNS läuft über zwei Schritte ab: 1.) die Bildung eines Anhydrids der Bromessigsäure, 2.) die Verknüpfung des Anhydrids mit der tRNS.

Zur Bildung des Anhydrids wurden 100 μ mole Bromessigsäure, gelöst in 50 μ l Dioxan, im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1 Std. mit 50 μ mole Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), gelöst in 50 μ l Dioxan, umgesetzt. Nach dieser Reaktion wurde der entstandene Harnstoff abzentrifugiert und der Überstand mit 100 μ l Dioxan versetzt, um die Stabilität des Anhydrids zu gewährleisten. Die (35 S)Met-tRNS_f^{Met} war in 800 μ l 0,2 M Natriumacetat Puffer, pH 5.0, gelöst. Zur tRNS Lösung wurde über einen Zeitraum von 1 Std. in drei Portionen das Bromessigsäureanhydrid-Dioxan Gemisch hinzugegeben. Zur schnellen Extraktion der Bromacethylierten tRNS wurde die Mischung einer Alkoholpräzipitation unterzogen. Die präzipitierte tRNS wurde nach 2 Std. bei -20°C durch eine niedrigtourige Zentrifugation sedimentiert und das Sediment in einen 2 mM KAc-Puffer pH 6.0, 1 mM MgCl₂ resuspendiert. Die so dargestellte bromacethylierte tRNS wurde bei -180°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.22. Isolation von Deoxyribonucleinsäure aus
Escherichia coli (28)

3 g bis zur logarithmischen Phase gewachsene Zellen (E. coli A19) wurden, nachdem sie geerntet waren, in 50 ml Saline-EDTA (0,15 M NaCl, 0,1 M

EDTA pH 8.0) gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden sedimentiert und in 25 ml der gleichen Saline-EDTA Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von 10 mg Lysozyme folgte eine Inkubation bei 37°C für 15 Min. Darauf wurden zum Resuspendat aus einer 25%igen Sodium-Lauroyl-Sulfat Lösung 2 ml gegeben, der eine zusätzliche Inkubation von 10 Min. bei 60°C folgte. Der Lyse des Resuspendats folgte eine starke Zunahme der Viskosität und eine Abnahme der Trübung. Die lysierte Suspension wurde mit Perchlorat auf 1 M eingestellt und der gesamte Ansatz mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamyalkohol (24:1) für 30 Min. bei Raumtemperatur (25°C) vorsichtig ausgeschüttelt. Nach einer niedrigtourigen Zentrifugation (5 Min., 3000 Upm, Sorvall Rotor Typ SS34) wurde die obere wässrige Phase gesammelt. Die Nukleinsäuren wurden durch eine Äthanol-fällung (2-fache Volumen Äthanol) vorsichtig präzipitiert und mit einem Stab aufgerollt. Das Präzipitat wurde dann in 10 - 15 ml verdünnter Saline-Citrat Lösung (15 mM NaCl, 1,5 mM Trinatrium-Citrat pH 7.0) aufgelöst. Die Lösung wurde vorsichtig geschüttelt, bis sich die DNS vollständig gelöst hatte. Mit einer konzentrierten Saline-Citrat Lösung (1,5 M NaCl, 0,015 M Trinatrium-Citrat pH 7.0) wurde die Suspension auf die Standard Saline-Citrat Konzentration (0,15 M NaCl, 0,015 M Trinatrium-Citrat) eingestellt. Wie schon beschrieben, wurde das gleiche Volumen Chloroform-

Isoamyläthanol hinzugegeben und für 15 Min. geschüttelt. Der Überstand wurde mit Alkohol behandelt. Nach mehreren solcher Deproteinisierungen (maßgebend für die Anzahl ist die Menge an Protein in der Interphasenschicht) wurde die DNS im 0,5 - 0,75 fachen Volumen des letzten Überstandes in Standard Saline-Citrat Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von RNase (50 $\mu\text{g/ml}$) folgte eine Inkubation von 30 Min. bei 37°C. Die RNasebehandlung ermöglichte die weitere Proteinabtrennung von der DNS. Nach Deproteinierungen mit Chloroform-Isoamylalkohol wurde die DNS in 9 ml verdünnter Saline-Citrat Lösung aufgenommen und nach erfolgter Suspension mit 1 ml Acetat-EDTA Lösung (3 M Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7.0) versetzt. Während die Suspension schnell rührte, wurde das 0,54 fache Volumen an Isopropylalkohol tropfenweise hinzugegeben. Die DNS präzipitierte unter diesen Bedingungen in fibröser Form, nachdem sie durch die Gelphase nach dem 0,5 fachen Volumen Isopropylalkohol gegangen ist. Ribonukleinsäuren und Oligoribonucleotide bleiben in Lösung. Das Präzipitat wurde in 70 - 95% (v/v) Äthanolalkohol vom Acetat freigewaschen, in 10 mM Tris·HCl Puffer pH 7.8 gelöst und bei 5°C gelagert.

2.23. Proteinextraktionen aus Ribosomen (29)

Ribosomensuspensionen in TMAI oder TMAII Puffern wurden durch Zugabe einer 1 M Lösung, 0,1 M an MgCl_2 , gemacht. Unter heftigem Rühren im Eisbad wurde dann

Eisessig hinzugefügt, so daß eine Endkonzentration von 67% (v/v) erreicht war. Nachdem die Suspension für 1 Std. im Eisbad gerührt hatte, wurde die ausgefallene DNS abzentrifugiert (Sorvall, 10 Min., 20 000 g, 4°C). Der Überstand wurde gegen das 500 - 1000 fache Volumen verdünnter Essigsäure bei 4°C dialysiert. Zuerst wurde einmal gegen 10%ige (v/v), dann zweimal gegen 5%ige (v/v) und schließlich zweimal gegen 2%ige (v/v) Essigsäure dialysiert. Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde dann gefriergetrocknet.

2.24. Zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese (30)

Die erste (1-D) und (2-D) Dimension der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in zwei voneinander getrennten Abschnitten durchgeführt. Das Gel der ersten Dimension (180 mm x 5 mm Ø, 8% Acrylamid, pH 9.6), in dessen Mitte die in 8 M Harnstoff gelösten ribosomalen Proteine einpolymerisiert waren, wurde, nachdem die Elektrophorese (39 Std., 90 V und 2,5 mA / Gel) abgelaufen war, in einem Dialyse Puffer, dessen Konzentration den Pufferbedingungen des Trenngels der zweiten Dimension entsprach, äquilibriert. Anschließend wurde das 1-D Gel an die quadratische Gelplatte der zweiten Dimension (200 x 200 x 6 mm, 18% Acrylamid, pH 4.6) anpolymerisiert.

Substanz	Lösung	1. Dimension			2. Dimension	
		Trenngel	Probengel	Elektroden-Puffer Dialysen-Puffer	Trenngel	Elektroden-Puffer
Harnstoff	3	36.3	48	36.0	360	
Acrylamid	3	4	4		180	
N,N'-Methylen-bisacrylamid	3	0.135	0.2		5	
EDTA-Na ₂	3	0.81	0.085	0.24		
Borsäure	3	3.23	0.32	0.96		
Tris	3	4.92				
TEMED	3	0.3	0.06	1.46	5.8	
Essigsäure	ml			0.78	52.3	1.5
5 N KOH	ml			2.4	9.6	
Glycin	g					14
pH-Wert		8.6		8.6	4.6	4.6
End-Vol.		99 ml	99 ml	1 l	967 ml	1 l
Polymerisation gestartet mit		1 ml 7% (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0.5 g Riboflavin 5 mg (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ in 1 ml		33 ml 10% (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	

Lösungen für die zweidimensionale Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Die Kapazität einer Gelplatte betrug bis zu 4 mg Protein eines ribosomalen Proteingemisches. Das bedeutete, daß bei 30S-Proteinen ca. 50 µg Protein / Fleck benötigt wurde. Die Laufzeit der zweiten Dimension betrug 26 Std., bei einer angelegten Spannung von 100 V floß ein Strom von 96 mA. Die Polymerisation der entgasten Polyacrylamid-Lösung wurde für die erste und die zweite Dimension mit Ammoniumperoxidisulfat-N,N,N',N'-Tetramethyläthyldiamin durchgeführt. Das Proteingel wurde photopolymerisiert (Riboflavin-Ammoniumperoxidisulfat). Die Proteine auf dem Elektropherogramm wurden durch Anfärben mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R-250 in dem Gel als blaue Flecken sichtbar gemacht. Nachdem die Gelplatten 15 Std. lang in einer 12,5%igen Trichloressigsäure äquilibriert waren, färbten die Gele in einer 0,1%igen Coomassie Brilliant Blau R-250 Lösung in 12,5% Trichloressigsäure über Nacht. In einer 10%igen Essigsäure wurden die Gele entfärbt.

2.25. Elektrophorese ribosomaler Proteine in Polyacrylamid Natriumdodecylsulfat-Gelen (31)

Ein Polyacrylamidgel mit der Zusammensetzung Acrylamid: N,N'-Methylenbisacrylamid wie 30 : 0,8 wurde zwischen zwei Glasplatten (16 x 14 x 0,3 cm) mit dem Abstand 1,5 mm gegossen. Das Gel bestand aus einem 5%igen "Spacer"-Gel (0,9 cm) und je nach Bedarf

aus einem 13,5%igen, 6.75%igen oder 3,5%igen Trenngel (9,8 cm lang). Das "Spacer"-Gel war 0,1%ig an Natriumdodecylsulfat und mit 0,063 M Tris HCl (pH 8.8) abgepuffert. Im Trenngel befand sich ebenfalls 0,1%ig Natriumdodecylsulfat, und 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7.2). Die Polymerisation der entgasten Polyacrylamid-Lösung wurde mit dem Redox-Katalysatorsystem Ammoniumperoxidisulfat - N,N,N',N' - Tetramethyläthylendiamin durchgeführt. Die Ausschnitte für die Proben wurden dadurch erreicht, daß ein Kamm mit 26 Stegen (ein Steg = 1,5 x 0,3 x 0,15 cm) sofort nach Gießen des "Spacer"-Gels in dasselbe geschoben wurde. Nach beendeter Polymerisation konnte der Kamm unter Zurücklassung der geformten Probenkammern herausgezogen werden. Als Referenzen wurden folgende Proteine verwendet:

<u>Protein</u>	<u>Molekulargewicht</u>
Cytochrome c	11,500
RNase A	13,600
ribosomales Protein S5	19,600
ribosomales Protein S4	26,000
Eialbumin	42,000
Rindereserumalbumin	67,000

Zum Zwecke der Denaturierung wurden die in Probenpuffer gelösten Proteine (1 mg/ml) für 2 Min. in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Um eine gut

sichtbare Bande nach Anfärben mit 0,1%iger Coomassie Brilliant Blau R-250 Lösung in 12,5%iger Trichlor-essigsäure für 2 Std. zu erhalten, mußten 2,5 µg Protein eingesetzt werden. Vor der Färbung wurde das Gel 1/2 Std. mit 12,5% Trichloroessigsäure äquilibriert. Entfärbt wurde das Gel mit 10%iger Essigsäure. Von ribosomalen Proteinen wurden jeweils 10 -15 µg / Probenkammer aufgetragen. Die Laufzeit betrug 20 Std. bei 6,5 V/cm. Es floß ein Strom von 30 mA.

2.26. Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamid-N-Lauroyl-Sarkosin-Gelen (32)

Zwischen zwei Glasplatten (25,5 x 18 x 0,3 cm) wurden 2,5 mm starke 17,5%ige Polyacrylamidgele gegossen, die mit 1,5% N,N'-Diallyltartardiamid versetzt und 0,5% cm N-Lauroyl-Sarkosin (Na-Salz) waren. Das Gel war mit 0,025 M Tris Phosphat Puffer (pH 7.8) gepuffert. Polymerisiert wurde das Acrylamid mit dem Redox-Katalysatorsystem Ammoniumperoxidisulfat-N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin. Durch einen vor der Polymerisation in die Acrylamid Lösung eingeschobenen Kamm blieben quaderförmige Vertiefungen (39 x 1 1/4 x 20,5 mm) im Gel ausgespart. In diesen Aussparungen konnten bis zu 100 µl Probe aufgetragen werden. Pro Probe wurde Protein aus ca. 3,5_{A260} 30S-Untereinheiten (687 µg = 208 pmole 30S) aufgetragen. Zur Feststellung

der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit wurde Bromphenol-Blau (pro Probe 5 μ l einer 1%igen wässrigen Lösung) verwendet. Pro cm lag eine Spannung von 8 V an, und es floß ein Strom von ca. 25 mA/Gelplatte. Nach beendeter Elektrophorese (Laufzeit betrug 20 - 24 Std.) wurde mit 25%iger Trichlor-essigsäure, die in 50%igem Methanol gelöst war, aus den Gelen das N-Lauroyl-Sarkosin (Na-Salz) herausgewaschen. Das stark geschrumpfte Gel wurde anschließend mit 0,1%iger Coomassie Brilliant Blau R-250 Lösung in 50%iger Trichloressigsäure für 10 Std. gefärbt, nachdem es mit 50%iger Trichloressigsäure äquilibriert war. Entfärbt wurde das Gel in zwei Schritten: 1.) mit einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Essigsäure (5:4:1) und 2.) mit 10%iger wässriger Essigsäure.

2.27. Auswertung der Polyacrylamid-Natriumdodecylsulfat- und N-Lauroyl-Sarkosin-Gele (32)

Im Falle der Polyacrylamid-Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese wurden die angefärbten Banden von radioaktiven Proben in 2,5 mm Abständen zerschnitten, in Szintillationsgläsern mit 100 μ l 30%igem H_2O_2 versetzt und gut verschlossen für 15 Std. auf 60°C erwärmt, um das Gel aufzulösen. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war,

wurden je 10 ml Bray's Szintillationscocktail hinzugefügt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Im Falle der Polyacrylamid-N-Lauroyl-Sarkosin-Gele wurden die radioaktiven Banden herausgeschnitten und in Stücke von 2,5 mm Breite zerteilt. Nach Auflösen mit 1 ml 2% Perjodsäure pro Stück in Szintillationsgläsern wurden 10 ml Szintillationscocktail (67 Vol. % Tolnol, 33 Vol. % Triton X - 100 und 5 g PPO pro l) pro Gläsern hinzugefügt und gekühlt in einem Szintillationszähler die Radioaktivität gemessen. Eine weitere Methode bot sich für beide Gelarten an, nämlich die fluorgraphische Methode zur Aufdeckung radioaktiven Materials (33). Dazu wurde das Gel direkt nach dem Färben zweimal 30 Min. in das 20 fache Volumen Dimethylsulphoxid (Me_2SO_4) gelegt. Äquilibriert mit Dimethylsulphoxid und auf die Hälfte geschrumpft, wurde das Gel für 3 Std. dem 4 fachen Volumen 20%igen (w/w) PPOs, gelöst in 22% (w/w) Dimethylsulphoxid, ausgesetzt. PPO ist sehr löslich in Dimethylsulphoxid, aber unlöslich in Wasser. Aus diesem Grund muß das Gel mit Dimethylsulphoxid äquilibriert werden. Gesättigt mit PPO wurde das Gel für 1 Std. in Wasser gelegt, wobei schlagartig PPO im Gel präzipitierte. Diese Prozedur ließ das Gel opaque werden, was aber nicht die fluorgraphische Effizienz beeinflusste. Das Gel war nun so präpariert, daß es unter Vakuum auf Whatman 3 MM Papier oder auf einem Leinenstoff mittels einer Pumpe (Leybold Heraeus D-1) getrocknet werden konnte. Zwischen

zwei Platten gespannt, in eine verschließbare, leicht geschützte Hülle gelegt, konnte das Gel mit der radioaktiven Probe den Röntgenfolienfilm (Cronex 2, DuPont) bei -70°C über einen variablen Zeitraum belichten.

2.28. Vorbereitung der Proben

Essigsäure-extrahierte Proteine wurden in Elektrophorese Puffer (bis zu 100 μl) aufgelöst und mit einer Spatelspitze Harnstoff bzw. Saccharose versetzt, um die Dichte der Lösung zu erhöhen. Mit Äthanol gefällte 30S- bzw. 70S-Partikel wurden pro A_{260} mit 1 μl RNase (1 mg/ml) in 10 - 20 μl Elektrophorese Puffer vermischt und 1/2 Std. bei 37°C inkubiert, anschließend wurde eine Spatelspitze Harnstoff bzw. Saccharose hinzugefügt. Diese Lösungen wurden mit Hamilton-Spritzen auf die Gele aufgetragen.

2.29. Lösungen für die Herstellung der Gelplatten

- | | | |
|----|-----------------------------------|-------------------|
| a) | 30 g Acrylamid | |
| | 2,5 g N,N'-Diallyltartardiamid | pro 100 ml Lösung |
| b) | 10 g N-Lauroyl-Sarkosin (Na-Salz) | |
| | auf pH 8 mit NaOH eingestellt | pro 100 ml Lösung |

- c) 50 ml Lösung b
25 ml eines 1 M Tris-Phosphorsäure-
puffers (pH 7.8) pro 100 ml Lösung
1,5 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylen-
diamin
- d) 1 g $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$ pro 100 ml Lösung
- e) Elektrophorese Puffer pro 3,5 l Lösung
 $\left[\begin{array}{l} 5 \times 10^{-3} \text{ M Tris Phosphorsäure Puffer pH 7.8} \\ 0,5\% \text{ N-Lauroyl-Sarkosin (Na-Salz)} \end{array} \right]$
175 ml Lösung b
17,5 ml 1 M Tris Phosphorsäure Puffer, pH 7.8

52,5 ml der Lösung a wurden mit Wasser auf 75 ml verdünnt und im Wasserstrahlpumpenvakuum entlüftet, 9 ml Lösung c und 6 ml Lösung d hinzugefügt, vermischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Nachdem der Raum luftblasenfrei eingesetzt war, wurden die Glasplatten für 1 Std. in handwarmes Wasser gestellt, damit eine temperaturkonstante Polymerisation stattfinden konnte.

2.30. Polyuridylsäure-abhängige Polyphenylalanin-Synthese (34)

Das zellfreie Polyphenylalanin-synthetisierende Reaktionsgemisch enthielt: Ribosomen, 70S- oder

(30S - 50S) - Partikel, S100 (eine Zellfraktion, die aus löslichen Enzymen besteht), Poly-Uridylsäure, ein Gemisch aus E. coli tRNS, Adenosintriphosphat, Guanosintriphosphat [^{14}C] Phenylalanin und Salze. Dieses Reaktionsgemisch wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert und danach im Eisbad gekühlt. Das Protein und das synthetisierte Poly[^{14}C] Phenylalanin wurde, nachdem das Inkubationsgemisch mit einem Tropfen 1,5%iger Rinderserumalbumin Lösung versetzt worden war, mit 2 ml 5%iger Trichloressigsäure ausgefällt. Um noch vorhandene [^{14}C] phe-tRNS^{phe} zu hydrolysieren, wurde das Gemisch 15 Min. lang auf 90°C erhitzt. Das Präzipitat wurde über Schneider & Schüll Glasfilterpapier ($\varnothing$ 24 mm) gesammelt und mit 3 x 2 ml 5%iger Trichloressigsäure nachgewaschen. Die Trichloressigsäure wurde mit einer Äther : Äthanol wie 1:1 Lösung herausgewaschen und gleichzeitig im Filter entwässert. Die unter einer Infrarotlampe getrockneten Filter wurden in Szintillationsgläsern mit 0,5 ml Soluene - 100 und 5 ml Szintillationscocktail (2,8 g PPO und 0,9 g POPOP/1 Toluol) versetzt. Darauf wurde die in den gekühlten Proben enthaltene Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

In einem Experimentalansatz

(80 μl) waren gelöst

Endkonzentration

1,3 μMol MgCl_2

16,3 mM

4,1 mMol $\text{Tris}\cdot\text{HCl}$ Puffer pH 7.9

50 mM

0,3 mMol NH_4Cl

3,7 mM

0,2 mMol	Dithiothreitol	2,5 mM
0,2 mMol	Adenosintriphosphat	2,5 mM
0,2 mMol	Guanosintriphosphat	2,5 mM
5 nMol	[¹⁴ C]Phenylalanine	62,5 mM
20 µg	Poly(U) = ca. 50 nM	0,6 µM
160 µg	<u>E. coli</u> tRNS-Gemisch	
5 µl	S100	
25-30 pmol	Ribosomen	0,3 - 0,4 µM

Das Gemisch wurde in einem Eisbad aus Stammlösungen zusammenpipettiert, die alle mit bidestilliertem Wasser angesetzt waren. Als letzte Komponente wurde das Enzymgemisch S100 hinzugefügt. Zur Kontrolle wurden Ribosomen bzw. Poly(U) durch ein entsprechendes Volumen an Wasser bzw. Puffer ersetzt.

2.31. Initiationskomplexbildung (35)

In Anwesenheit von Triplet AUG und Initiationsfaktoren (IF-1, IF-2, IF-3) wurden mit fMet-tRNS_f^{Met} und Ribosomen bei 30° für 15 Min. Initiationskomplexe gebildet, die sich auf Nitrocellulosefiltern (Millipore HAWP 0,45 µ) filtrieren ließen.

<u>Ein Ansatz enthielt in 80 ul</u>	<u>Endkonzentration</u>
0,6 µMol MgCl ₂	7,5 mM
4,0 µMol Tris·HCl Puffer pH 7.8	50 mM

8	$\mu\text{Mol NH}_4\text{Cl}$	100	mM
0,16	$\mu\text{Mol Guanosintriphosphat}$	2	mM
0,24	$\mu\text{Mol Dithiothreitol}$	3	mM
2,5	$\mu\text{Mol AUG}$	31	mM
ca. 23	pMol Ribosomen	0,29	mM
60	pMol f ^[³H] Met-tRNS _f ^{Met}	0,75	mM
10	$\mu\text{l ungereinigte Initiations-}$ faktoren		

Durch Austausch von GTP gegen Guanyl-(β,γ -methylen) diphosphat (GMP P (CH₂) P wurde die GTP-Abhängigkeit der Reaktion überprüft. Sollte die Puromycin-Sensivität der fMet-tRNS_f^{Met}-Bindung an das Ribosom geprüft werden, so wurde der Ansatz verdoppelt (160 μl), 15 Min. bei 30°C inkubiert und eine Hälfte des Ansatzes (80 μl) mit 8 μl 10 mM Puromycinlösung in Methanol (Endkonzentration 1 mM) versetzt. Beide Proben wurden für weitere 15 Min. bei 30°C inkubiert, anschließend über Nitrocellulosefilter filtriert und dreimal mit je 2 ml eiskaltem Puffer (10 mM Tris·HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 30 mM NH₄Cl und 6 mM 2-Mercaptoäthanol) nachgewaschen. Zur Kontrolle der Reaktion wurden die Initiationsfaktoren durch Puffer bzw. das AUG durch Wasser ersetzt. Die Filter wurden unter einer Infrarotlampe getrocknet und in Szintillationsgläsern mit je 10 ml Szintillationscocktail (2,8 g PPO und 0,9 g POPOP/1 Toluol) versetzt. Die Radioaktivität der gekühlten Proben wurde in einem Szintillationszähler gemessen.

2.32. Deoxyribonucleinsäure-abhängige Ribonuclein-
säure-Polymerase-Reaktion (19)

In Anwesenheit von allen vier Nucleotiden, Salzen und Deoxyribonucleinsäure wurde mit der Deoxyribonuclein-säure-abhängigen Ribonucleinsäure-Polymerase (Ribonucleo-sid Triphosphat : RNS Nucleotidyl Transferase, EC 2.7.7.6) Ribonucleinsäure synthetisiert. Das Syntheseprodukt ließ sich nach 5%iger Trichloressigsäure (10 mM Natriumphos-phat) Präzipitation auf Nitrocellulosefiltern (Millipore HAWP 0,45 μ) abfiltrieren.

<u>Der Inkubationsansatz enthielt</u>	<u>Endkonzentration</u>
<u>pro 50 μl</u>	
2,0 μ Mol Tris-HCl Puffer pH 7.8	40 mM
0,5 μ Mol $MgCl_2$	10 mM
0,05 μ Mol EDTA	0,1 mM
2,5 μ g Rinderserumalbumin	0,1 mM
7,5 μ Mol KCl	150 mM
0,25 μ Mol KH_4PO_4 pH 7.5	0,5 mM
7,5 nMol CTP	0,15 mM
7,5 nMol GTP	0,15 mM
5 - 75 nMol ATP	0,10 mM bzw. 0,15 mM
5 - 7,5 nMol UTP	0,10 mM bzw. 0,15 mM
0,86 nMol ^{14}C ATP	16,2 μ M
0,025 nMol bzw. 3H UTP	0,5 μ M
0,75 - 5 μ g DNS (<u>E. coli</u> bzw. λ plac5DNS)	
10 - 20 μ g RNS-Polymerase (ca. 10 - 20 pmole)	

Der Experimentalansatz wurde für 10 Min. bei 37°C inkubiert und im Eisbad mit 3 ml 5%iger Trichloressigsäure präzipitiert. Nach einer Verweilzeit von 15 Min. im Eisbad wurde das Präzipitat über Millipore Filter filtriert und mit 3 x 4 ml 2%iger Trichloressigsäure (10 mM Natriumphosphat) nachgewaschen. Beide Trichloressigsäurelösungen enthielten Natriumphosphat, um zu vermeiden, daß radioaktives UTP bzw. ATP am Filter band. Da die Nucleotidtriphosphatlösungen, je nach Alter und Qualität Nucleotiddiphosphate enthielten, ließ sich eine Polynucleotid Phosphorylase Aktivität durch eine Zugabe von 0,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7.5 pro Ansatz vermeiden, welche in dieser Konzentration die RNS-Polymeraseaktivität nicht beeinflußte.

2.33. Zellfreie Synthese von β -Galaktosidase (25,26)

Das zellfreie β -Galaktosidase-synthetisierende Reaktionsgemisch enthielt: Einen Reaktionsmix, die präinkubierte S30 Fraktion (A19 / 514), 3',5'-cyclisches Adenosinmonophosphat (neutralisiert mit KOH auf pH 7.0 in 0,01 M Tris-Acetat Puffer), destilliertes Wasser und λ plac5DNS in 0,01 M Tris-Acetat Puffer (pH 8.0). Außer der DNS wurden alle Komponenten im Eis pipettiert. Zum Schluß wurde die viskose DNS hinzugegeben. Es war darauf zu achten, daß eine weite Pipette benutzt wurde und jeweils die identische Menge an DNS (Viskosität) pro Ansatz beigegeben wurde.

<u>Zusammensetzung des</u>		<u>Endkonzentration</u>	
<u>Reaktionsmixes pro ml</u>		<u>im Assay</u>	
176	µMol Tris Acetat pH 8.2	44	mM
220	µMol Kaliumacetat	55	mM
5,6	µMol Dithiothreitol	1,4	mM
29,6	µMol Calciumacetat	7,4	mM
108	µMol Ammoniumacetat	27	mM
0,88	µMol Aminosäuren	0,22	mM jede
8,8	µMol ATP	2,2	mM
84	µMol Phosphoenolpyruvat	21	mM
2	µMol 3',5' cyclisch AMP	0,5	mM
400	µg tRNS	10	µg
108	µg Folinsäure	2,7	µg
2,2	µMol CTP	0,55	mM
2,2	µMol UTP	0,55	mM
2,2	µMol GTP	0,55	mM

Jeder Syntheseansatz mit einem Volumen von 100 µl enthält

- 25 µl Reaktionsgemisch
- 20 - 30 µl Enzymfraktion
- 10 - 20 µl λplac5DNS
- 1 µl Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG), 1 mM

Endkonzentration

Die benötigte Menge an Enzymfraktion muß jeweils optimal durch eine Konzentrationsreihe angetestet werden.

Schwankungen in der Aktivität sind vom Alter der Präparation und vom Zustand der benutzten bakteriellen Zellen abhängig. Ähnliches gilt für die Menge an α -lact DNS. Isopropylthiogalactosid dient als Induktor für das lac-operon, sofern das benutzte System einen entsprechenden Repressor besitzt. Die Menge an ITPG ist abhängig von der vorhandenen Menge an Repressor. Eine Endkonzentration von 1 mM ITPG / Ansatz ist hinreichend groß genug. Es hat sich als nützlich erwiesen, in dem oben dargestellten Reaktionsmix drei Substanzen auszulassen und selbige als separate Lösungen für jeden Experimentalansatz zu benutzen.

1.) $MgCl_2$: Das β -Galaktosidase-synthetisierende System ist sehr stark von der Mg^{2+} -Konzentration abhängig. Eine optimale Darstellung verlangte demnach zwangsläufig nach einer Mg^{2+} -Konzentrationsreihe. Eine solche Konzentrationsabhängigkeit ließ sich aber nur zur höheren Konzentration hin darstellen, wenn von einer gegebenen Konzentration ausgegangen werden muß.

2.) Der Einbau von Radioaktivität in das darzustellende Enzym ließ sich leicht erreichen, wenn eine der zwanzig Aminosäuren ausgelassen und bei Nichtbedarf extra zugesetzt wurde.

3.) Das Phosphoenolpyruvat schien sehr stark gegen starke Temperaturschwankungen empfindlich zu sein, so daß nach mehrmaligen Auftauen und Einfrieren die Instabilität des Enzyms enorm zunahm. Daher war

es zu empfehlen, für jedes Experiment eine frische Phosphoenolpyruvatlösung zu erstellen. Nach einer Inkubation von 30 - 40 Min. bei 37°C, in der die Lösung trübe wurde, wobei jedoch die Trübung kein Maß für Syntheseaktivität darstellt, wurde zum Ansatz 0,7 ml β -Galaktosidase Mix [0,1 M Natriumphosphat, pH 7.3, 0,14 M 2-Mercaptoäthanol, 0,35 mg/ml Orthonitrophenyl-Galaktosid (ONPG)] gegeben. Ein Maß für die de novo synthetisierte β -Galaktosidase stellte die Hydrolyse von ONPG dar. Nachdem eine meßbare Gelbfärbung eingetreten war, wurde pro Ansatz 10 μ l Eisessig hinzugegeben, und um das entstehende Präzipitat zu entfernen, folgte eine niedrigtourige Zentrifugation (10 Min., 5000 g, 4°C). Der Überstand wurde mit 0,8 ml 1 M Na₂CO₃ vermenngt und die OD bei 420 m μ gegen Wasser abgelesen.

2.34. Bestimmung der ATP- und GTP-Hydrolyse (36)

Zur Bestimmung der GTPase bzw. ATPase Aktivität in einer Chromosomenpräparation aus Escherichia coli, wie sie unter 2.17. beschrieben wurde, wurde der gesamte Gradient auf eine solche Aktivität hin durchgetestet. Für die hier beschriebenen hydrolytischen Aktivitäten wurden folgende optimale Bedingungen bestimmt: 20 μ l der betreffenden Gradientenfraktion (10 mM Tris·HCl Puffer pH 8.2, 1 mM

Mercaptoäthanol, 1 mM Äthylendiamin-tetra-acetat (EDTA), 5 mM MgCl_2 und unterschiedliche Mengen an Sucrose 2 - 6% im Ansatz) wurden mit 0,16 mM (γ - ^{32}P) ATP oder 0,024 mM (γ - ^{32}P) GTP in 0,1 M Magnesiumchlorid, 30 mM Ammoniumchlorid, 6 mM 2-Mercaptoäthanol und 0,1 M Tris·HCl 7.8 inkubiert. Im Falle der ATPase-Reaktion bei 30°C für 45 Min und im Falle der GTPase-Reaktion bei 37°C für 60 Min. Das Reaktionsvolumen betrug 100 μl . Nach der Inkubation wurden die Proben auf Eis gestellt und mit 5 μl 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat und 0,1 ml 1 M Perchlorsäure versetzt. Das bei der ATP oder GTP Hydrolyse freigesetzte anorganische Phosphat konnte mit zwei Methoden bestimmt werden. 1.) Die mit Kaliumdihydrogenphosphat und Perchlorsäure vermischten Proben wurden für 2 Min. mit 0,3 ml 20 mM Ammoniummolybdat und 0,5 ml Essigsäureisopropylester für 1 Min. auf einem Vortex-Mixer gut vermischt. Nach einer weiteren niedrigtourigen Zentrifugation wurden 0,2 ml der organischen Phase abpipetiert und in Bray's Szintillationsflüssigkeit gezählt. 2.) Die mit Kaliumdihydrogenphosphat und Perchlorsäure behandelten Proben wurden mit 0,5 ml Alkoholsuspension (Norit A, 40 mg/ml) für 2 Min. vermischt und danach bei 10 000 U μm /5 Min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 0,5 ml Aliquote des Überstandes in 5 ml Bray's Szintillationsflüssigkeit gezählt.

3. RESULTATE

3.1. Assoziation von nicht-ribosomalen Proteinen mit Ribosomen

E. coli Ribosomen werden mit 1 M Ammoniumchlorid behandelt, um nicht-ribosomale Proteine, die mit dem Ribosom assoziiert sind, abzuwaschen. Diese Waschfraktion wird normalerweise zur Darstellung von Translationsfaktoren verwendet. Sie enthält jedoch auch ribosomale Proteine, die bei dieser Prozedur mit abgewaschen werden, wie durch eine Analyse mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese gezeigt werden konnte (Abb. 2). Aus einem Vergleich von Abb. 1 und Abb. 2 ist ersichtlich, daß folgende Proteine der 50S Untereinheit: L1, L2, L3, L⁴, L5, L6, L7, L8/9, L11, L10/12, L13, L17, L21 bzw. der 30S Untereinheit: S1, S2, S3, S4, S5, S8, S9, S15 in dieser Proteinfraction enthalten sind. Mit dieser Analysenmethode lassen sich jedoch nicht nicht-ribosomale Proteine, wie Translationsfaktoren oder DNS-abhängige RNS-Polymerasen identifizieren. Zur Identifikation dieser Proteine mußten deswegen andere Wege beschritten werden. So wurde die Waschfraktion 1. auf verschiedene biologische Aktivitäten hin untersucht, die charakteristisch für die jeweiligen Proteine sind, und 2. mittels geeigneter säulenchromatographischer Verfahren und mittels SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

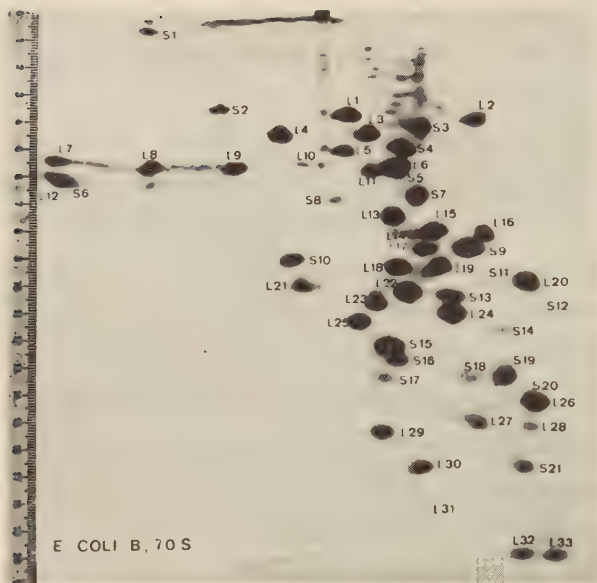


Abb.: 1

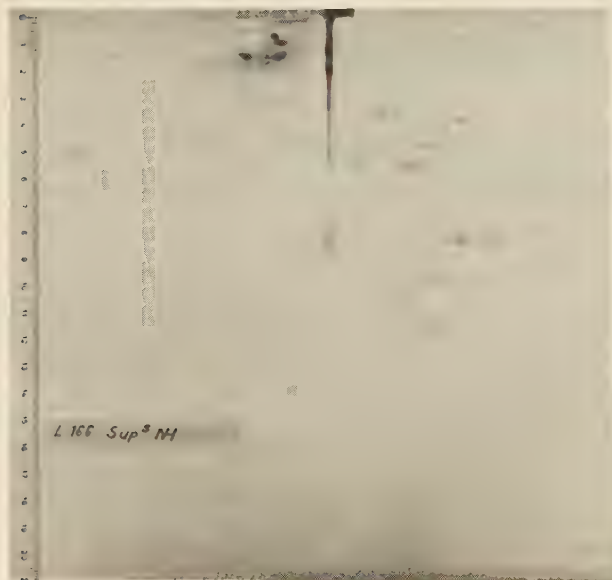


Abb.: 2

Abb. 1 und 2 2D-Elektrophoretogramm von 70S ribosomalen Proteinen (Abb. 1) aus E. coli B, sowie von Proteinen, die mit 1 M Ammoniumchlorid von E. coli Ribosomen abgewaschen wurden (Abb. 2). Die erste Dimension, 4% Acrylamid, pH 8.6; die zweite Dimension 18% Acrylamid, pH 4.6. In der ersten Dimension ist die Anode links, in der zweiten Dimension ist die Anode oben. In Abb. 1 sind die Proteine mit 66% Essigsäure und 3×10^{-3} M Mg extrahiert worden. Der Maßstab auf den Gelen links ist in Zentimetern angegeben. Für Puffer und Gelbedingungen siehe im Material und Methoden-Teil Abschnitt 2.24.

In Übereinstimmung mit der Literatur (37,38) befindet sich auf dem ungewaschenen E. coli Ribosom bzw. in der abgewaschenen Proteinfraction der Elongationsfaktor EFT, der die Phe-tRNS^{phe}-Bindung an das Ribosom stimuliert. Aus Tab. 2 ist ersichtlich, daß ungewaschene Ribosomen genügend EFT enthalten und in hoher Ausbeute Phe-tRNS^{phe} binden.

Tab. 2 Polyuridylsäure-abhängige Phe-tRNS^{phe}-Bindung an E. coli Ribosomen

Ribosomen	gew. Ribosomen	Wash	MolPhe-tRNS ^{phe} /MolRib.
+	-	-	0,60
-	+	+	0,39
-	+	-	0,08

Das Experiment fand unter den optimierten Testbedingungen statt, wie sie im Material und Methoden-Teil (Abschnitt 2.31.) beschrieben sind, mit dem Unterschied, daß Phe-tRNS^{phe} (1,8 μ M) und Poly(U) (5 mM) angeboten wurde.

Weiterhin wurde die Anwesenheit von Initiationsfaktoren in Ribosomenpräparationen gemessen (Tab. 3). Die Bindung von fMet-tRNS^{Met}_f an Ribosomen in Abhängigkeit von AUG war fast genauso gut wie die Bindung von

fMet-tRNS_f^{Met} an gewaschene Ribosomen bei Zusatz einer optimalen Menge Initiationsfaktoren, die aus der 1 M NH₄Cl Waschfraktion angereichert worden waren. Daraus folgt, daß ungewaschene Ribosomen auch genügend Initiationsfaktoren assoziiert enthalten, um in der Initiation der Proteinsynthese aktiv zu sein. Diese Initiationsfaktoren sind in der Waschfraktion enthalten, aus der sie in angereicherter Form isoliert werden können (Abschnitt 2.7.).

Tab. 3 Initiationsfaktoren-abhängige fMet-tRNS_f^{Met}-
Bindung an E. coli Ribosomen

Ribosomen	gew. Ribosomen	AUG	IF	MolfMet-tRNS _f ^{Met} /MolRib.
-	+	+	+	0,80
-	+	+	-	0,12
-	-	+	+	0,12
-	+	-	+	0,2
-	-	-	-	0,02
+	-	+	-	0,6

Die experimentellen Bedingungen für diesen Test sind im Material und Methoden-Teil unter Abschnitt 2.31. ausführlich beschrieben.

Als nächstes wurde die Poly(U)-abhängige Polyphenylalaninsynthese untersucht, indem gewaschene bzw. unge-

waschenen Ribosomen, Poly(U), tRNS^{phe} und eine Enzymfraktion, die Synthetasen enthielt (S100), unter geeigneten Bedingungen inkubiert wurden. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Tab. 4.

Tab. 4 Polyuridylsäure-abhängige Polyphenylalaninsynthese in Abhängigkeit von gewaschenen und ungewaschenen E. coli Ribosomen

Ribosomen	gew. Ribosomen	S100	Phe-tRNS ^{phe}	Aktivität (%) ⁺
+	-	+	+	100
+	-	-	+	37
+	-	+	-	3½
+	-	-	-	3
-	-	+	+	1
-	-	+	-	2
-	+	+	+	60
-	+	+	-	45
-	+	-	+	0,5

⁺ Die Menge an Poly(¹⁴C) Phenylalanin, die von 1_{A260} 70S Ribosomen synthetisiert wurde, wurde als 100% gesetzt, das entsprach 60 - 80 Mol (¹⁴C) Phenylalanin/Mol 70S Ribosom. Weitere experimentelle Angaben sind im Abschnitt 2.30. enthalten.

Daraus folgt, daß ungewaschene Ribosomen in der Lage sind, ohne Zusatz von Synthetasen Polyphenylalanin zu synthetisieren, d.h., daß der Elongationsfaktor EFG und auch Synthetasen, bzw. in diesem spe-

zifischen Falle eine Phenylalanin-Synthetase, mit Ribosomen assoziiert sind. Gewaschene Ribosomen sind dagegen frei von Synthetasen und zeigen in diesem System keine Aktivität.

In einem weiteren Experiment wurde gefunden, daß in der Proteinfraction nicht nur Translationsfaktoren bzw. Synthetasen, sondern auch Transkriptionsproteine enthalten sind. Es konnte gezeigt werden, daß Inkubation von λ plac5DNS mit ungewaschenen Ribosomen und mit der aus dem Überstand isolierten S100 Fraktion zur Synthese von β -Galaktosidase führt (Tab. 5). In diesem komplexen System werden sämtliche entsprechenden Proteine gebraucht, die zur Transkription, d.h. der Umschreibung von DNS in mRNA und zur Translation, d.h. der Umschreibung von mRNA in Protein notwendig sind.

Tab. 5 Einfluß von Ribosomen auf λ plac5DNS-abhängige in vitro β -Galaktosidase Synthese

Rib.	gew. Rib.	S30	Waschfraktion	S100	Aktivität(%) ⁺
-	-	+	-	-	100
+	-	-	-	-	0
+	-	-	-	+	140
-	+	-	+	+	130
-	+	-	-	+	0
-	+	-	+	-	0

⁺ Das Experiment fand unter optimierten Testbedingungen statt. Der 100%ige Wert entspricht einem A_{420} -Wert von 0,4, nach einer enzymatischen Inkubationszeit von 2 Std./37°C, unter den in Abschnitt 2.33. beschriebenen Experimentalbedingungen. 100% = $4,4 \times 10^{-3}$ units β -Galaktosidase.

Wie aus den in Tabelle 4 und 5 dargestellten Ergebnissen zu ersehen ist, synthetisieren Ribosomen unter Zusatz der S100 Protein Fraktion DNS-abhängige β -Galaktosidase. Da in der S100 Protein Fraktion keine nennenswerte RNS-Polymerase Aktivität enthalten ist (siehe Tab. 6), bedeutet dies, daß auch Transkriptionsfaktoren wie die RNS-Polymerase mit Ribosomen assoziiert sind und als Assoziat isoliert werden können, während gewaschene Ribosomen unter Zusatz der S100 Protein Fraktion Polyphenylalanin synthetisieren können (Tab. 4), d.h. Translation von mRNA durchführen können, sind sie erst dann in der Lage zu transkribieren, d.h. DNS-abhängig β -Galaktosidase zu synthetisieren, wenn das Inkubationsgemisch durch die Waschfraktion supplementiert wird. Entsprechend den obigen Befunden mit ungewaschenen Ribosomen läßt sich daraus folgern, daß in der Waschfraktion neben Translationsfaktoren auch RNS-Polymerase enthalten ist. Um direkt nachzuweisen, daß DNS-abhängige RNS-Polymerase mit Ribosomen assoziiert ist, wurden (³⁵S)-Methionin

markierte Ribosomen präpariert. Die (^{35}S)-markierten Proteine dieser Ribosomen wurden mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt bzw. analysiert. Die densitometrische Auswertung des entsprechenden Autoradiogramms zeigte einen Doppelpipfel an der Stelle im Gel, wo sich die beiden β, β' -Untereinheiten von gereinigter Polymerase befinden, die als Referenz im Gel mitlief (Fig. 1). Die β, β' -Untereinheiten der RNS-Polymerase lassen sich in einem 3,75% Polyacrylamidgel sehr leicht erkennen, da sie die größten Proteine im E. coli Bakterium darstellen bzw. die einzigen Proteine sind, die ein so hohes Molekulargewicht aufweisen. Die Ergebnisse dieser elektrophoretischen Befunde stützen somit die vorherigen Befunde, daß RNS-Polymerase mit Ribosomen assoziiert ist.

Wie gezeigt wurde, besitzen Ribosomen Polymeraseaktivität. Dementsprechend sollte in der abgewaschenen Proteinfraction RNS-Polymeraseaktivität nachgewiesen werden können. Sie wurde, wie im experimentellen Teil beschrieben (Abschnitt 2.32.), auf Polymeraseaktivität getestet. Zum Vergleich wurde ebenfalls die S100 und die S.T.E.-Enzymfraktion auf Polymeraseaktivität untersucht (Tab.6). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen in Übereinstimmung mit den vorherigen Resultaten, daß nur wenig RNS-Polymerase im Zellüberstand als gelöstes Protein vorliegt; RNS-Polymeraseaktivität findet

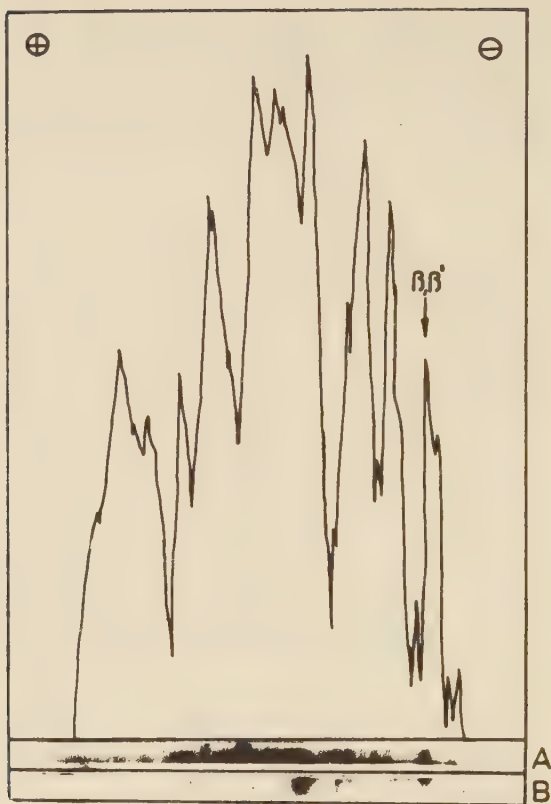


Fig. 1 Elektrophoretische Protein-Auftrennung von (^{35}S)-Methionin markierten ungewaschenen Ribosomen auf 3,75% Polyacrylamidgelen in Natriumdodecylsulfat. (A) Proteinbild der markierten Ribosomen. Die in den einzelnen Banden enthaltene Radioaktivität wurde durch Autoradiographie (experimenteller Teil, Abschnitt 2.27.) bestimmt und der belichtete Film densitometrisch ausgewertet (—). Die densitometrische Auswertung des Autoradiogrammes ist oberhalb des Proteinbilds dargestellt. (B) Proteinbild von gereinigter RNS-Polymerase.

sich im wesentlichen in der Proteinfraction, die von Ribosomen mit 1 M Ammoniumchlorid abdissoziiert wird.

Tab. 6 Polymeraseaktivität in der abgewaschenen Proteinfraction von Ribosomen und von Zellüberständen

Polymerase	S100	Proteinfraction	S.T.E.	Aktivität(%) ⁺
-	10 µg	-	-	0,5
-	20 µg	-	-	0,65
-	30 µg	-	-	0,65
-	-	10 µg	-	7
-	-	20 µg	-	16
-	-	30 µg	-	30
-	-	-	40 µg	2
-	-	-	80 µg	2
-	-	-	120 µg	2
30 µg	-	-	-	100

⁺ RNS-Polymeraseaktivität wurde gemessen durch Einbau von (³H)-UTP in Trichloressigsäure präzipitierbares Material. Der 100%ige Wert entspricht 500 pmol (³H)-UTP Einbau. Weitere experimentelle Angaben sind in Abschnitt 2.32. gegeben.

3.2. Wechselwirkung zwischen Initiator-tRNS und RNS-Polymerase

Die Untersuchungen in 3.1. ergaben also, daß neben Translationsfaktoren und Synthetasen auch Transkriptionsenzyme mit dem Ribosom assoziiert sind. Es ergab sich daraus die Frage, welche Bedeutung dies hat und ob eine Wechselbeziehung zwischen Transkriptions- und Translationsproteinen besteht. Deshalb war es sinnvoll, RNS-Polymerase zu reinigen und in geeigneten funktionellen Testen auf solche Wechselbeziehungen hin zu untersuchen.

3.2.1. fMet-tRNS_f^{Met}-Bindung an RNS-Polymerase -----

Um einen eventuellen Einfluß der RNS-Polymerase auf der Translationsebene festzustellen, wurde in Gegenwart von RNS-Polymerase fMet-tRNS_f^{Met} an Ribosomen gebunden. Im Inkubationsgemisch befanden sich gewaschene Ribosomen, die in Abhängigkeit von einer Initiationsfaktorenpräparation und in Abhängigkeit des Initiationstriplets AUG f(³H)Met-tRNS_f^{Met} banden. Einen Überblick über die Ergebnisse dieser Untersuchungen gibt die Tab. 7.

Tab. 7 Initiationskomplexbildung in Gegenwart von RNS-Polymerase, AUG bzw. Poly AUG und Initiationsfaktoren

gew. Rib.	Poly AUG	AUG	$f(^3\text{H})\text{Met-tRNS}_f^{\text{Met}}$	IF	RNS-Polym	cpm
+	+	-	+	-	25 pmol	15000
+	+	-	+	-	50 pmol	16800
+	+	-	+	-	125 pmol	18000
+	-	+	+	-	25 pmol	22000
+	-	+	+	-	50 pmol	24000
+	-	+	+	-	125 pmol	27800
+	+	-	+	+	25 pmol	43000
+	+	-	+	-	-	13500

Das Experiment fand unter optimierten Testbedingungen statt. Die experimentellen Einzelheiten sind im Material und Methoden-Teil (Abschnitt 2.31.) beschrieben.

Aus dieser Tabelle ist zu erkennen, daß RNS-Polymerase eine Affinität zur $f(^3\text{H})\text{Met-tRNS}_f^{\text{Met}}$ besitzt, wobei in Gegenwart des Initiationstripletts AUG die Affinität höher zu sein scheint als in Gegenwart von Poly (A,U,G). Es wurde deshalb in einem weiteren Experiment die Bindung von $f(^3\text{H})\text{Met-tRNS}_f^{\text{Met}}$ an RNS-Polymerase in Abwesenheit von Ribosomen untersucht.

Tab. 8 Komplexbildung zwischen RNS-Polymerase $\pm \delta$
 Faktor und fMet-trNS_f^{Met} in Abwesenheit von
 Ribosomen

Poly (A,U,G) oder AUG	fMet- trNS _f ^{Met}	IF	RNS-Polym. $\pm \delta$	$\pm \delta$	pmole fMet-trNS _f ^{Met} gebunden
+	+	+	-	-	1,9
+	+	-	+	-	12,0
-	+	-	+	-	12,2
-	+	-	-	+	5,0

Die experimentellen Bedingungen sind im Material und Methoden-Teil (Abschnitt 2.31.) beschrieben. Es wurde 35 pmole RNS-Polymerase und 60 pmole f(³H)Met-trNS_f^{Met} je nach Testbedingung angeboten.

Aus den Ergebnissen in Tabelle 8 ist zu erkennen, daß RNS-Polymerase eine hohe Affinität zur Initiator-trNS, auch in Abwesenheit von Ribosomen, besitzt. Diese Affinität wird durch Poly (A,U,G) oder durch AUG nicht beeinflußt. Die Ausprägung dieser Affinität ist jedoch sehr abhängig von der Form, in der das Enzym vorliegt. Als Holoenzym, d.h. RNS-Polymerase plus Sigma-Faktor, ist die Bindung sehr stark. Abdissoziation des Sigma-Faktors führt zu einer starken Abnahme der Initiator-trNS Bindung. Ein Vergleich der Ergebnisse von Tabelle 7 und 8 zeigt, daß die Gegenwart von Ribosomen das Vermögen der RNS Polymerase, f(³H)Met-trNS_f^{Met} zu binden,

inhibiert. Das bedeutet wahrscheinlich, daß RNS-Polymerase und Ribosom miteinander um die Bindung von fMet-tRNS^{Met}_f kompetieren. Es ergibt sich nun die Frage, ob die Bindung von fMet-tRNS^{Met}_f an RNS-Polymerase spezifisch ist. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob nicht auch andere aminoacylierte tRNS unter denselben Versuchsbedingungen an Polymerase binden. Entsprechend wurden Phe-tRNS^{phe}, Met-tRNS^{Met}_m, Met-tRNS^{Met}_f und fMet-tRNS^{Met}_f mit RNS-Polymerase inkubiert. Die Tabelle 9 gibt die Resultate dieser Untersuchungen wieder.

Tab. 9 Bindung von Phe-tRNS^{phe}, Met-tRNS^{Met}_m, fMet-tRNS^{Met}_f und Met-tRNS^{Met}_f an RNS-Polymerase

Met-tRNS ^{Met} _f	Phe-tRNS ^{phe}	Met-tRNS ^{Met} _m	fMet-tRNS ^{Met} _f	RNS-Polym.	pmole aat.RNS gebunden
-	+	-	-	+	0,0
-	-	+	-	+	1
-	-	-	+	+	5
+	-	-	-	+	1

Die Experimentalbedingungen sind im Material und Methoden-Teil (Abschnitt 2.31.) beschrieben. Zusätzlich wurden pro Test 40 pmole RNS-Polymerase und jeweils 25 pmole der betreffenden Aminoacyl-tRNS angeboten.

Die in der Tabelle 9 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß fMet-tRNS_f^{Met} von RNS-Polymerase bevorzugt gebunden wird, im Vergleich zur Phe-tRNS^{phe} etwa 6 x besser und im Vergleich zur Met-tRNS_M^{Met} bzw. Met-tRNS_f^{Met} etwa 5 x besser.

Das bedeutet, daß die Formylierung von Met-tRNS_f^{Met} sehr entscheidend für die Bindung von Initiator-tRNS an RNS-Polymerase ist und somit die Formylierung wesentlich zur Spezifität der Initiator-tRNS-RNS Polymerase Wechselwirkung beiträgt.

3.2.2. Vergleichende Polyacrylamidgelanalyse von RNS-Polymerase und von IF-2 Präparationen

Durch Untersuchungen von Travers ist gezeigt worden, daß der Elongationsfaktor EFT eine hohe und spezifische Affinität an RNS-Polymerase besitzt (39, 40). Da nicht auszuschließen war, daß die von uns benutzte RNS-Polymerase Präparation eventuell Initiationsfaktor IF-2 enthielt und dadurch die Affinität zur fMet-tRNS_f^{Met} hervorgerufen wurde, wurde der Initiationsfaktor IF-2 aus der Protein Waschfraktion der Ribosomen angereichert und durch die RNS-Polymerase aus Zellextrakt. In diesem Zusammenhang ist wichtig, daß IF-2 und fMet-tRNS_f^{Met} zusammen keinen Millipore filtrierbaren Komplex bilden, d.h. die in Tabelle 8 und 9 zusammengefaßten Ergebnisse können nicht auf

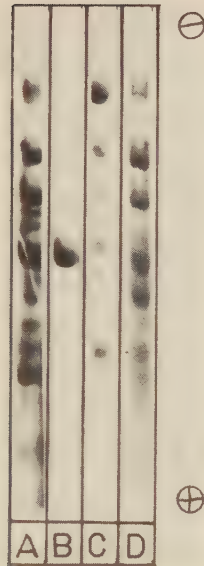


Abb. 3 Anreicherung der RNS-Polymerase und die Analyse der einzelnen Schritte durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese im Vergleich zum Proteinbild einer IF-2 Initiationsfaktorpräparation. Weitere experimentelle Angaben für die Darstellung der RNS-Polymerase sind im Abschnitt 2.15., für die Darstellung von IF-2 im Abschnitt 2.8. gegeben.

- (A) Proteinbild der RNS-Polymerase Präparation nach der DEAE-Cellulose Chromatographie.
- (B) Proteinbild der RNS-Polymerase Präparation nach dem ersten Glycerolgradienten.
- (C) Proteinbild der RNS-Polymerase Präparation nach dem zweiten Glycerolgradienten.
- (D) Proteinbild der IF-2 Initiatorfaktorpräparation.

Verunreinigung durch IF-2 beruhen. Es besteht aber die Möglichkeit, daß IF-2 ähnlich wie EF-Tu an RNS-Polymerase bindet und dadurch wiederum die Bindung von Initiator-tRNS an RNS-Polymerase stimuliert. IF-2 wurde dargestellt, wie es im Abschnitt 2.8. unter Material und Methoden beschrieben wurde, die RNS-Polymerase wurde dargestellt, wie es im Abschnitt 2.15. in Material und Methoden beschrieben wurde. Dabei zeigte sich, daß sich bei den anfänglichen Reinigungsschritten (Ammoniumsulfatfällung, DEAE-Cellulosesäule, Glycerolgradienten bzw. Phosphocellulosesäule) IF-2 und RNS-Polymerase neben einer Reihe anderer Proteine sich sehr ähnlich verhalten. Wählt man für RNS-Polymerase die Reinigungsmethode von Schaller, dann findet man vor dem letzten Reinigungsschritt (DNS-Cellulosesäule) noch IF-2 zusammen mit RNS-Polymerase assoziiert. Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, enthält das IF-2 enthaltende RNS-Polymerase-Protein Assoziat, das aus angereicherten Zellextrakten durch Glycerolgradienten isoliert wurde, ähnliche Proteine wie eine angereicherte IF-2 Präparation, die durch Ammoniumsulfatfällung, DEAE-Cellulosesäule, Phosphocellulosesäule und Ultrafiltration erhalten wurde.

Aus dem Vergleich der Proteinzusammensetzung der verschiedenen Präparationen kann geschlossen werden, daß RNS-Polymerase nicht nur mit EFT assoziiert, sondern auch mit IF-2.

3.2.3. Immunologische Kurzreaktion zwischen RNS-Polymerase und IF-2-Präparationen

Die sicherste und eleganteste Methode der Identifikation von Proteinidentität ist die Immunodiffusion nach Ouchterlony. Deshalb wurden gegen die oben beschriebene IF-2 Präparation in Kanninchen Antikörper erzeugt und isoliert (41,42). Abb. 4 zeigt die immunologische Analyse der IF-2 Präparation (2.8.) mit Anti-IF-2-Serum. Wie zu erkennen ist, ergaben Antikörper und Antigen 3 Präzipitationsbanden. Anschließend wurde der IF-2 Antikörper auch gegen die RNS-Polymerase Präparationen eingesetzt. Um zu zeigen, daß die IF-2 Präparation aus der 1 M NH_4Cl Waschfraktion und die RNS-Polymerase Präparationen, die durch Glycerolgradientenzentrifugation aus angereicherten Zellextrakten erhalten wurde, immunologische Kreuzreaktion ergeben. Das Ergebnis der Immunodiffusion (Abb. 5) zeigt, daß tatsächlich beide RNS-Polymerase Präparationen eine Präzipitationsbande mit Anti-IF-2 bilden. Weiterhin ist aus Abb. 6 ersichtlich, daß beide Antigene die gleiche Determinante zum Antikörper besitzen, da sich die Präzipitationsbanden zwischen IF-2 Präparation und Anti-IF-2 und die von RNS-Polymerase-Präparation und Anti-IF-2 überschneiden. Aus diesen Experimenten kann eindeutig geschlossen werden, daß Proteine mit Ribosomen sedimentieren und sich außerdem über mehrere chromatographische

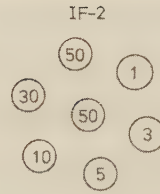
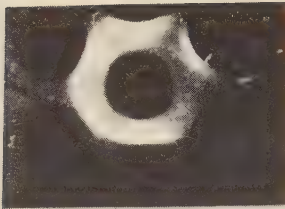
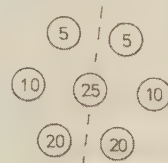


Abb. 4

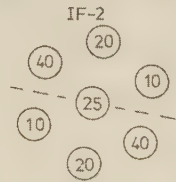
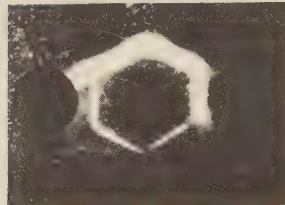


1. RNS-Polymerase



2. RNS-Polymerase

Abb. 5



RNS-Polymerase

Abb. 6

Abb. 4, 5, 6

Immunodiffusionstest nach Ouchterlong zur Identifikation von Proteinidentitäten in Agarosegelen. In allen drei Abbildungen geben die Zahlen die Menge in μl an, die in die Löcher einpipettiert wurde. In allen drei Zentrallöchern ist Anti-IF-2-Serum. Abb. 4 zeigt die immunologische Analyse der IF-2 Präparation. Abb. 5 zeigt die immunologische Analyse zweier RNS-Polymerase Präparationen. Abb. 6 zeigt das immunologische Ergebnis, in der Kombination der Experimentalansätze, wie sie in Abb. 4 und 5 dargestellt sind. Für weitere experimentelle Einzelheiten siehe Literaturangabe 41, 42.

Schritte mit IF-2 anreichern lassen, die immunologisch identisch sind mit Proteinen, die auch eine hohe Affinität zur RNS-Polymerase besitzen, da sie mit diesen Enzymen zusammen über zwei konsekutive Zentrifugationen in Glycerolgradienten kosedimentieren.

3.2.4. Affinitätsmarkierung von RNS-Polymerase mit bromacytylierter Met-tRNA_f^{Met}

Um nun zu zeigen, daß die Bindung von fMet-tRNA_f^{Met} an RNS-Polymerase auch dann spezifisch ist, wenn die RNS-Polymerase mit IF-2 und anderen Proteinen (siehe Abb. 4 - 6) assoziiert ist, wurde die RNS-Polymerase Präparation (Abb. 3) mit dem chemisch reaktiven fMet-tRNA_f^{Met}-Analogon BrAcMet-tRNA_f^{Met} unter den gleichen Bedingungen wie in Tabelle 8 und 9 umgesetzt. Das gesamte Inkubationsgemisch wurde mit SDS gekocht und auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Über den Weg der Autoradiographie konnte durch densitometrische Messung gezeigt werden, daß vorwiegend die beiden Untereinheiten der RNS-Polymerase mit BrAc Met-tRNA_f^{Met} markiert wurden (Fig. 2). Zur Kontrolle, daß die Reaktion der bromacytylierten Met-tRNA_f^{Met} spezifisch war, wurde die bromacytylierte Met-tRNA_f^{Met} mit RNase behandelt, mit Harnstoff versetzt und danach mit RNS-Polymerase inkubiert. Das entsprechende Autoradiogramm zeigt, daß praktisch unter diesen Bedin-

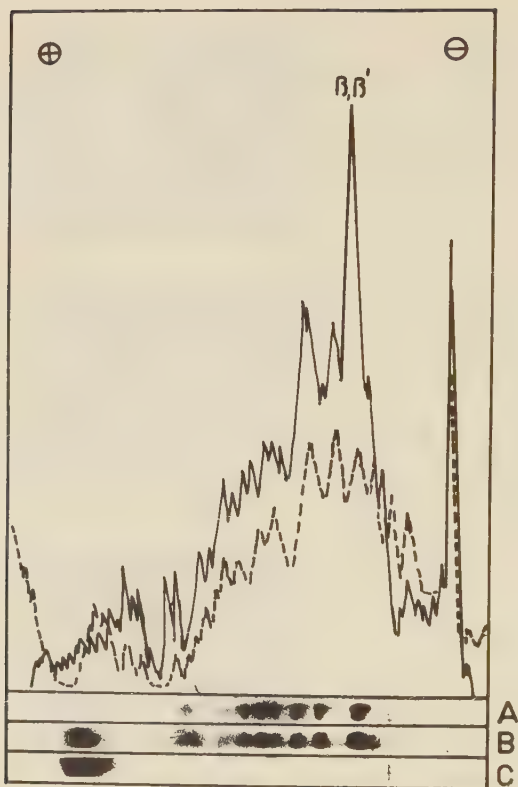


Fig. 2 Elektrophoretische Protein-Auftrennung von (^{14}C)bromacytilierter $\text{Met-tRNA}_{\text{Met}}$ markierter RNS-Polymerase auf 3,75% Polyacrylamidgelen in Natriumdodecylsulfat. (A) Proteinbild der markierten RNS-Polymerase. (B) Proteinbild der markierten RNS-Polymerase, bei der die $\text{Brachet-tRNA}_{\text{Met}}$ vor der Inkubation mit RNase behandelt wurde. (C) Proteinbild von RNase. Die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme ist oberhalb der Proteinbilder dargestellt. Im Falle von (A) $\rightarrow$ (—), im Falle von (B) $\rightarrow$ (---).

gungen die β, β' -Untereinheiten der RNS-Polymerase nicht markiert wurden, während der unspezifische Untergrund bei beiden Umsetzungen vergleichbar ist. Dies wurde verdeutlicht in Fig. 2, wo die densitometrischen Daten der Proteinbilder beider Inkubationen dargestellt sind. Dies zeigt, daß nur intakte BrAcMet-tRNS_f^{Met} mit der β, β' -Untereinheit von RNS-Polymerase reagiert.

3.3. Einfluß von Initiator-tRNS auf die DNS-abhängige in vitro Synthese von β -Galaktosidase

In einem DNS-abhängigen in vitro System wurde untersucht, ob die in Abschnitt 3.2. beschriebene spezifische Bindung von Initiator-tRNS an RNS-Polymerase die Transkriptions-Eigenschaften dieses Enzyms beeinflussen. Unter Verwendung von λ plac5DNS wurde die in vitro Synthese von β -Galaktosidase gemessen. Im Inkubationsgemisch wurden die Einflüsse von fMet-tRNS_f^{Met}, Met-tRNS_m^{Met} und Phe-tRNS^{phe} auf die β -Galaktosidase Synthese untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tab. 10 Wirkung von fMet-tRNS^{Met}_f, Met-tRNS^{Met}_m, Phe-tRNS^{phe} und dem ribosomalen Protein S1 im β -Galaktosidase synthetisierenden System

λ plac5 DNS	fMet- tRNS ^{Met} _f	Met- tRNS ^{Met} _m	Phe- tRNS ^{phe}	S1	A ₄₂₀
+	+	-	-	-	1,72
+	-	+	-	-	0,28
+	-	-	+	-	0,37
+	-	-	-	-	0,34
+	-	-	-	+	0,78

Das Experiment fand unter optimierten Testbedingungen statt. Der A₄₂₀-Wert von 0,34 nach einer enzymatischen Inkubationszeit von 3 Std. bei 37°C unter den in Abschnitt 2.33. in Material und Methoden beschriebenen Experimentalbedingungen entspricht $3,8 \times 10^{-3}$ units β -Galaktosidase.

Die β -Galaktosidase Synthese wurde optisch mit Hilfe von Nitrophenylgalaktosid, wie in Material und Methoden beschrieben, gemessen. Die Ergebnisse der Tabelle 10 zeigen, daß fMet-tRNS^{Met}_f in diesem System die Proteinsynthese sehr stark stimuliert. Dagegen zeigen der Zusatz von Met-tRNS^{Met}_m und von Phe-tRNS^{phe}, die im Vergleich zu fMet-tRNS^{Met}_f in äquimolaren Mengen zugesetzt wurden, keinen bemerkbaren Einfluß auf die Syntheserate des Systems.

In der Literatur wurde berichtet, daß ribosomales Protein S1 RNS-Polymerase stimuliert. Dementsprechend wurde der Einfluß von S1 auf die DNS-abhängige β -Galaktosidase Synthese gemessen. Ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit dem von fMet-tRNA_f^{Met} zeigt jedoch, daß die Stimulierung der RNS-Polymerase Aktivität durch fMet-tRNA_f^{Met} weitaus größer und signifikanter ist. Um nun eindeutig sagen zu können, daß die durch fMet-tRNA_f^{Met} Zusatz hervorgerufene Zunahme an β -Galaktosidase Synthese tatsächlich auf einer Steigerung der m-RNS Synthese und nicht etwa auf erhöhter Initiation der ribosomalen Proteinsynthese beruht, wurde die Zeitabhängigkeit der DNS-abhängigen RNS-Synthese in An- und Abwesenheit von Initiator tRNA gemessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die zeigen, daß Initiator tRNA tatsächlich die Aktivität der RNS-Polymerase stimuliert, sind zusammen mit entsprechenden Untersuchungen mit E. coli Chromosomen als DNS-Template in Abschnitt 3.5. dargestellt.

3.4. Bindung von Initiator tRNA an E. coli Chromosomen

In den vorherigen Untersuchungen wurde gefunden, daß neben EFT (11,40) auch IF-2 und fMet-tRNA_f^{Met} eine hohe Affinität zur RNS-Polymerase besitzen. Ferner konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Initiator-tRNA an

RNS-Polymerase die Transkription von λ DNS sehr stark stimuliert. Da es sich bei λ DNS um die Transkription von Phagen DNS handelt, bei der nur mRNA bzw. tRNA von RNS-Polymerase synthetisiert werden kann, war es wichtig, festzustellen, ob die Transkription von E. coli Chromosomen, bei der vorwiegend stabile RNS synthetisiert wird (43), durch Initiator-tRNA in gleichem Maße beeinflusst wird. Es wurden deshalb E. coli Chromosomen nach der von Worcel und Kornberg (23) beschriebenen Methode isoliert. Diese Isolierungsmethode vermeidet weitestgehend eine Denaturierung der E. coli Chromosomen, die im nativen Zustand einen S-Wert von 4000 besitzen. Zunächst wurden E. coli Chromosomen durch Sucrose-Gradienten Zentrifugation isoliert. Es wurde untersucht, in wieweit diese Chromosomen noch RNS-Polymerase enthalten und in wieweit sie extern zugesetzter RNS-Polymerase als Template dienen können. Zur besseren Identifizierung der Chromosomen wurde die DNS während des Zellwachstums mit (^3H)-Thymin markiert. Fig. 3 zeigt das erhaltene Sedimentationsprofil und die mit den einzelnen Fraktionen verbundene RNS-Polymerase Aktivität. Es ist deutlich zu sehen, daß E. coli Chromosomen noch RNS-Polymerase assoziiert enthalten. Setzt man jedoch extern RNS-Polymerase den entsprechenden Inkubationsgemischen zu, so erhöht sich der Einbau von (^3H)-UTP in Trichloressigsäure präzipitierbares Material etwa fünffach, d.h.

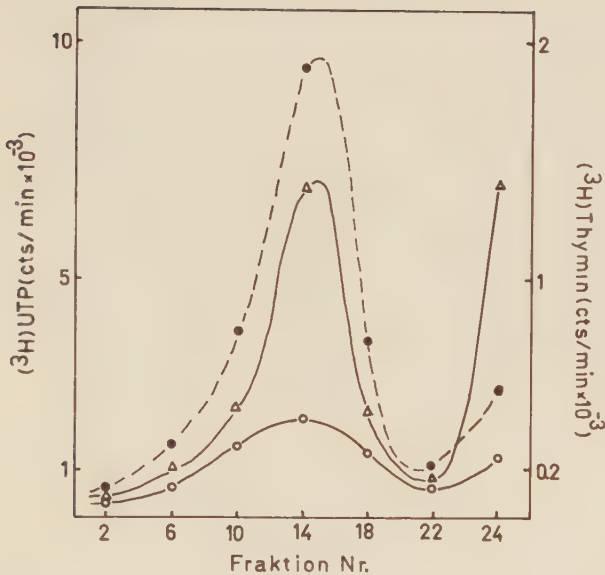


Fig. 3 RNS-Polymeraseaktivität von E. coli Chromosomen, die über einen 10-30% Sucrosegradienten sedimentiert wurden, wie in Material und Methoden beschrieben (Abschnitt 2.17.). (^3H) Thymin markierte DNS (-Δ-); 10 μl aliquote des Gradienten wurden mit 10 μl Bray's vermischt zur Bestimmung der Radioaktivität; mit E. coli Chromosomen assoziierte RNS-Polymeraseaktivität (-○-). RNS-Polymeraseaktivität wurde durch Einbau von (^3H)-UTP in Trichloressigsäure präzipitierbares Material gemessen; Stimulierung des (^3H)-UTP Einbaus (-●-) in Trichloressigsäure präzipitierbares Material durch extern zugesetzte RNS-Polymerase (50 μmole). Das Experiment fand unter DNS-abhängigen Protein-Synthese Bedingungen statt (Abschnitt 2.33.), in einem Volumen von 50 μl .

die E. coli Chromosomen synthetisieren in der gleichen Zeiteinheit (20') durch Zusatz von RNS-Polymerase fünfmal mehr RNS. Es ist interessant, daß entfaltete DNS bzw. denaturierte Chromosomen (Fraktion 23 - 26), die während der Zentrifugation nicht in den Gradienten hineinsedimentieren aufgrund ihres wesentlich geringeren S-Wertes von 1400, zwar noch intern RNS-Polymeraseaktivität besitzen, aber kaum noch als Template für zugesetzte RNS-Polymerase, d.h. für die Neuinitiation von RNS-Synthese dienen können. Wie aus Fig. 3 ersichtlich, sedimentiert RNS-Polymerase mit E. coli Chromosomen. Es wurde deshalb untersucht, ob E. coli Chromosomen selbst, d.h. ohne Zusatz von RNS-Polymerase, $fMet-tRNA_f^{Met}$ binden können. Experimentell wurde ähnlich verfahren wie oben. E. coli Chromosomen wurden durch Sucrose-Gradienten Zentrifugation isoliert, worauf hin jede einzelne Fraktion auf $fMet-tRNA_f^{Met}$ Bindungsaktivität untersucht wurde. In Fig. 4 sind die Ergebnisse eines solchen Experiments dargestellt, die zeigen, daß tatsächlich $fMet-tRNA_f^{Met}$ an E. coli Chromosomen bindet! Zur Absicherung dieses Befundes wurden noch zwei zusätzliche Experimente durchgeführt, die zeigen sollten, daß die Bindung von Initiator tRNA an E. coli Chromosomen spezifisch ist und nicht durch mit den Chromosomen eventuell assoziierte Ribosomen hervorgerufen wird. Zunächst wurden (^{35}S) markierte Ribosomen präpariert. Diese radioaktiv markierten Ribosomen wurden dann gleich nach der Zellyse dem Zellaufschluß zugesetzt, der

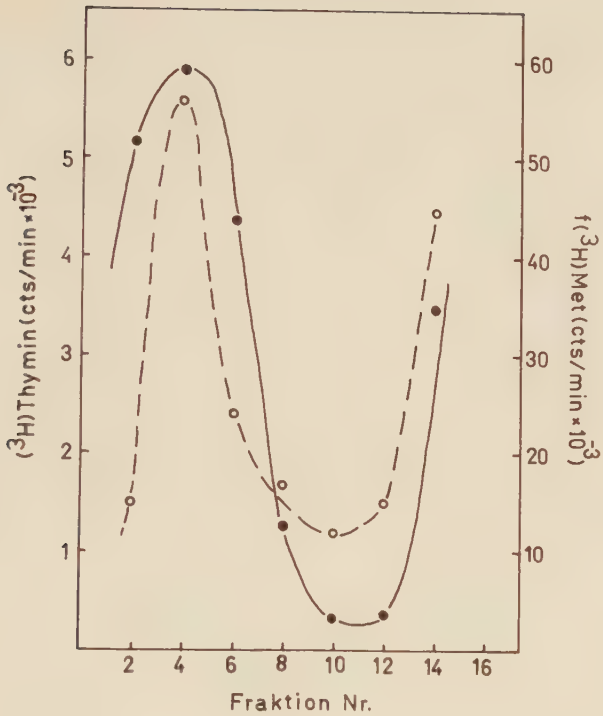


Fig. 4 Sucrosegradienten Zentrifugation von E. coli Chromosomen (●-●). Von jeder Fraktion wurde ein Aliquot (20 µl) entnommen und auf f(³H)Met-tRNA^{Met} Bindung (-○-) untersucht. Dem Inkubationsansatz (80 µl) wurden 50-60 pmole f(³H)Met-tRNA^{Met} hinzugefügt. Für weitere Einzelheiten der Versuchsbedingungen siehe experimenteller Teil 2.31.

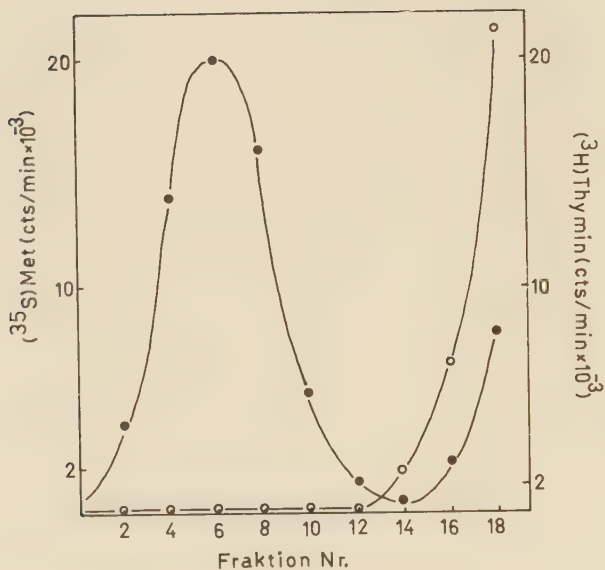


Fig. 5 Zentrifugation von *E. coli* Chromosomen über einen 10-30% Sucrosegradienten (●-). Dem Zellaufschluß wurden 5 OD_{A₂₆₀} (³⁵S)-Methionin markierte Ribosomen zugesetzt (○-) und zusammen mit den Chromosomen, wie unter 2.17. beschrieben, mitzentrifugiert.

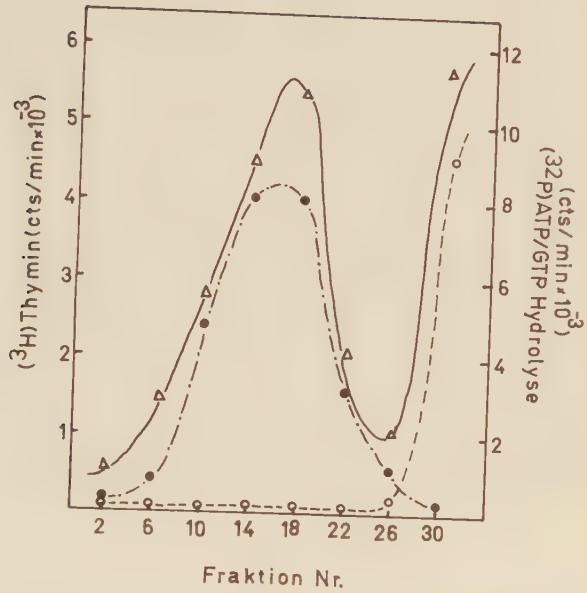


Fig. 6

Darstellung von *E. coli* Chromosomen (Δ) über einen 10-30% Sucrosegradienten. Von jeder Fraktion wurde ein Aliquot (20 μl) entnommen und auf GTP-(o-) bzw. ATP-Hydrolyseaktivität (•-) getestet. Für weitere Einzelheiten der Versuchsbedingungen siehe experimenteller Teil 2.34.

dann zur Isolierung der Chromosomen verwendet wurde. Das Ergebnis dieses Experiments (siehe Fig. 5) war eindeutig negativ. Daraus kann geschlossen werden, daß im Zellsaft vorhandene Ribosomen nicht mit den Chromosomen kosedimentieren. Weiterhin wurde untersucht, in wieweit E. coli Chromosomen in der Lage sind, GTP zu hydrolysieren, was vor allem ein Charakteristikum von Ribosomen und Translationsfaktoren ist. Fig. 6 zeigt, daß auch das nicht der Fall ist, während die als Kontrolle gemessene Hydrolyse von ATP, die u.a. von DNS-Polymerase III durchgeführt wird (44), unter gleichen experimentellen Bedingungen stattfand. Diese Befunde unterstützen das Ergebnis der in Fig. 4 dargestellten Experimente, d.h. fMet-tRNS_f^{Met} bindet an E. coli Chromosomen.

3.5. Einfluß von Initiator tRNS auf die Transkription von λ DNS und Escherichia coli Chromosomen

Die DNS-abhängige β -Galaktosidase Synthese wird durch Zusatz von fMet-tRNS_f^{Met} deutlich stimuliert (siehe Abschnitt 3.3.). Da der Einfluß von fMet-tRNS_f^{Met} bei diesen Experimenten auch erklärt werden kann durch eine eventuelle Stimulierung der Translation von β -Galaktosidase mRNA auf dem Ribosom, wurde die RNS-Synthese direkt gemessen, indem RNS-Polymerase und λ DNS zusammen inkubiert wurden in

Abwesenheit aller anderen zur Proteinsynthese notwendigen Faktoren. Fig. 7 zeigt den zeitlichen Verlauf der RNS-Synthese über 40', die bestimmt wurde anhand des Einbaus von (^{14}C)-ATP in Trichloressigsäure präzipitierbares Material. Der Zusatz von $\text{Met-tRNS}_m^{\text{Met}}$ hat, wie schon bei den Messungen der β -Galaktosidase Synthese beobachtet wurde, keinen Einfluß auf die RNS-Synthese. Der Zusatz von $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$ jedoch stimuliert die RNS-Synthese sehr stark. Nach 40' wurde etwa 4 - 5 mal soviel RNS synthetisiert wie in Abwesenheit von $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$. Diese Stimulierung der RNS-Synthese stimmt sehr gut mit derjenigen überein, die (siehe Tab. 10) für die Synthese von β -Galaktosidase gefunden wurde. Daraus läßt sich eindeutig schließen, daß die Bindung der $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$ an RNS-Polymerase zu einer Stimulierung der RNS-Polymerase Aktivität und damit zu einer signifikanten Erhöhung der RNS-Synthese führt. Um festzustellen, ob die Bindung von $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$ die generelle Syntheserate oder aber spezifisch die Initiation der RNS-Synthese stimuliert, wurde während der gesamten in Fig. 7 dargestellten Kinetik die Bindung von $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$ an Polymerase verfolgt. Die zugehörigen Daten sind in Fig. 7 zusammen mit der Kinetik der RNS-Synthese dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$ nur zu Beginn der RNS-Synthese an Polymerase bindet, nicht aber während des weiteren Syntheseablaufs. Demzufolge, stimuliert $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$

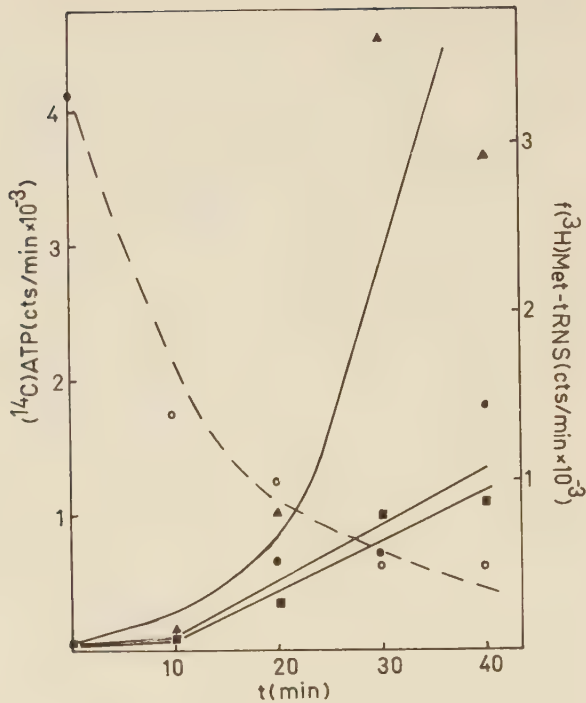


Fig. 7 Kinetik des (^{14}C) -ATP Einbaus ($-\blacksquare-$) in Trichlor-essigsäure präzipitierbares Material mit λ plac5DNS als Template, präpariert wie im experimentellen Teil Abschnitt 2.18. beschrieben. Einfluß von $f\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ ($-\blacktriangle-$) und $\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ ($-\circ-$) auf den (^{14}C) -ATP Einbau. Abnahme der $f(^3\text{H})$ -Met-tRNA_f Bindung an Polymerase ($-\bullet-$). Es wurde zum Inkubationsansatz (30 μl) extern RNS-Polymerase (20 pmole) hinzugegeben. Aliquots (7 μl) der λ plac5DNS wurden bei 9,5 mM MgCl_2 ; 30 mM Tris-HCl (pH 7.8) und 125 mM KCl als Template benutzt. Sowohl an $f\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ als auch an $\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ wurden 20 pmole pro Ansatz hinzugefügt. Für weitere Einzelheiten der Versuchsbedingungen siehe experimenteller Teil 2.22.

die Initiation der Transkription. Initiator tRNS-RNS-Polymerase Komplexe sind offensichtlich nicht stabil während der Propagationsphase der Transkription. Es war nun interessant zu sehen, ob die beobachtete Bindung von fMet-tRNS_f^{Met} an E. coli Chromosomen den gleichen Effekt auf die Polymeraseaktivität hat wie oben beobachtet wurde im Falle von λ DNS.

Diese Versuche unterscheiden sich jedoch in zwei wesentlichen Punkten von den vorherigen Experimenten mit λ DNS. Zum einen transkribiert RNS-Polymerase von E. coli DNS überwiegend stabile RNS und kaum mRNS; zum anderen war zu erwarten, daß der größere Anteil der mit E. coli Chromosomen assoziierten RNS-Polymerase schon an naszierende RNS gebunden ist und somit für eine Ketteninitiation nicht in Frage kommt. Demzufolge war es nicht überraschend, daß fMet-tRNS_f^{Met} und erst recht Met-tRNS_f^{Met} die E. coli DNS abhängige RNS-Synthese unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht stimulieren (Fig. 8). Dieser Beobachtung entspricht der Befund, daß die Halbwertszeit des fMet-tRNS_f^{Met} - E. coli Chromosomen-Komplex von 25' wesentlich größer ist als in Falle des λ DNS-Polymerase-Initiator tRNS-Komplexes, wo die Halbwertszeit lediglich 3 Minuten beträgt.

Die in diesem Abschnitt berichteten Ergebnisse zeigen also, daß fMet-tRNS_f^{Met} die Initiation der Transkription von λ DNS in mRNS stimuliert, aber

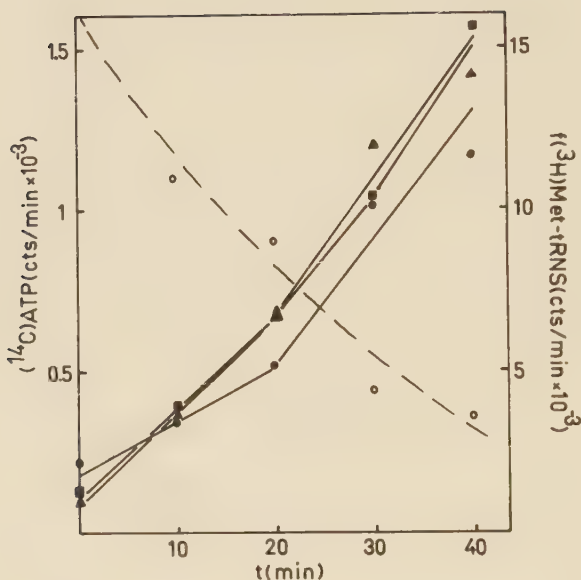


Fig. 8

Kinetik des (^{14}C)-ATP Einbaus (—■—) in Trichlor-
essigsäure präzipitierbares Material mit *E. coli*
Chromosomen als Template, präpariert wie im ex-
perimentellen Teil Abschnitt 2.17. beschrieben.
Einfluß von fMet-tRNA_f^{Met} (—▲—) und Met-tRNA_f^{Met}
(—●—) auf den (^{14}C)-ATP Einbau. Abnahme der $f(^3\text{H})$
Met-tRNA_f^{Met} Bindung an Polymerase (—○—). Es wurde
zum Inkubationsansatz (30 µl) extern RNS-Polymerase
(20 pmole) hinzugegeben. Aliquots (7 µl) der *E. coli*
Chromosomen wurden bei 9,5 mM MgCl₂; 35 mM Tris·HCl
(pH 7.8) und 125 mM KCl als Template benutzt. Sowohl
an fMet-tRNA_f^{Met} als auch an Met-tRNA_f^{Met} wurden 20
pmole pro Ansatz hinzugefügt. Für weitere Einzel-
heiten der Versuchsbedingungen siehe experimenteller
Teil 2.32.

keinen Einfluß auf die Transkription von E. coli Chromosomen in stabile RNS hat.

Aus den beobachteten Wechselwirkungen zwischen Initiator tRNS, RNS-Polymerase und DNS muß deshalb geschlossen werden, daß die Initiation von mRNS-Synthese und die Initiation von mRNS-Übersetzung durch die Rolle von $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$ direkt miteinander gekoppelt sind. In Abwesenheit von $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$ findet nicht nur keine Proteinsynthese auf dem Ribosom statt, sondern auch die Initiation der mRNS Synthese durch RNS-Polymerase ist um eine Größenordnung vermindert.

4. DISKUSSION

Ein regulatorischer Mechanismus auf der Ebene der Initiation, der RNS- und Protein Synthese verbindet, wurde bereits in einer kurzen Mitteilung anhand von genetischen Untersuchungen von Trimetoprim-resistenten Mutanten vermutet (45). Trimetoprim ist ein Inhibitor des Tetrahydrofolat-Metabolismus der prokaryotischen Zelle. Dabei wurden überraschenderweise auch Trimetoprim - resistente Mutanten gefunden, die gleichzeitig Rifampicin oder Streptomycin bzw. Spectinomycin - resistent waren (46). Behandlung von E. coli Zellen mit Trimetoprim führt zur Inhibierung des Tetrahydrofolat-Metabolismus, wodurch Initiator tRNS nicht mehr formyliert werden kann. Es ist deshalb auf den ersten Blick überraschend, daß Resistenz gegen die Wirkung von Trimetoprim nicht nur durch eine entsprechende Veränderung im Tetrahydrofolat-Metabolismus hervorgerufen wird, sondern auch durch Mutation in Genen, die für RNS-Polymerase bzw. für ribosomale Proteine codieren. Dieser Befund läßt sich nun aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse über die Wirkung von Initiator tRNS auf RNS-Polymerase erklären.

Resistenz gegen Trimetoprim kann entweder direkt auf der Resistenz der Tetrahydrofolat-Reduk-

tase beruhen oder aber darauf, daß die Zelle fMet-tRNA_f^{Met} nicht mehr für RNS Synthese bzw. für Proteinsynthese benötigt. Deshalb kann es zu einer direkten Resistenz gegen Trimetoprim kommen, indem RNS-Polymerase oder Ribosomen formylierte Initiator tRNA nicht benötigen.

Wichtig ist, daß Mutation in Streptomycin-Genen die fMet-tRNA_f^{Met} Abhängigkeit von RNS-Polymerase aufhebt bzw. umgekehrt Mutation im Rifampicin-Locus die fMet-tRNA_f^{Met} Abhängigkeit von Ribosomen aufhebt. Diese Beobachtungen entsprechen den in dieser Arbeit gefundenen in vitro Daten, daß Initiator tRNA - wahrscheinlich im Verband mit IF-2 Initiation von mRNA - und Initiation von Proteinsynthese direkt miteinander koppelt. In diesem Zusammenhang paßt auch die kürzlich gemachte Beobachtung, daß Mutation in Str A-Locus die Transkriptionseigenschaften von RNS-Polymerase verändert (13).

Wie in Abschnitt 3.3. und 3.5. gezeigt wurde, stimuliert die spezifische Bindung von fMet-tRNA_f^{Met} an RNS-Polymerase die mRNA Synthese. Im Gegensatz dazu wurde gefunden (39,40), daß die Bindung von EF-Tu an RNS-Polymerase die Synthese von rRNA stimuliert. Zieht man in Betracht, daß die Ergebnisse in Abschnitt 3.1. und 3.2. zeigen, daß IF-2 und RNS-Polymerase miteinander assoziiert sind und IF-2 wahrscheinlich im RNS-Polymerase-Initiator-tRNA-Komplex notwendiger Bestandteil ist, so ergibt sich

für den Einfluß von Translationsfaktoren mit RNS-Polymerase ein sehr wichtiger Regulationsmechanismus, der in seiner Art völlig neu ist und noch nicht beschrieben wurde. Dieser Regulationsmechanismus ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

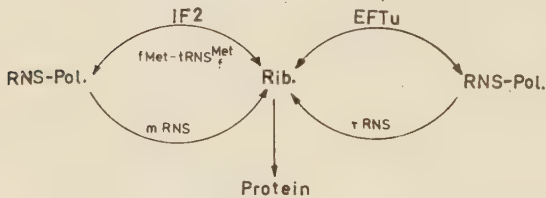


Abb. 7

RNS-Polymerase kann generell durch Transkriptionsfaktoren gesteuert werden, so daß entweder rRNS oder aber mRNS synthetisiert wird. Die Steuerung wird durchgeführt durch das Vorhandensein der Translationsfaktoren und das Vorhandensein von formylierter Initiator tRNS. Sind beide Komponenten ausreichend vorhanden, dann wird sowohl mRNS als auch rRNS gemacht, d.h. stabile RNS und Proteinsynthese sind, wie beobachtet wird, miteinander gekoppelt. Wird jedoch das Formylierungssystem abgeschaltet, dann wird keine mRNS mehr synthetisiert, d.h. umgekehrt,

die Synthese von $\text{fMet-tRNA}_f^{\text{Met}}$ schaltet die mRNA-Synthese an. Dem entspricht die gefundene Stimulierung der DNS-abhängigen in vitro Synthese von β -Galaktosidase durch $\text{fMet-tRNA}_f^{\text{Met}}$ (Abschnitt 3.3.). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß kürzlich gefunden wurde, daß die Gene von RNS-Polymerase Untereinheiten, von EF-Tu und von ribosomalen Proteinen auf dem E. coli Chromosom benachbart sind (12), was dafür spricht, daß nicht nur die Transkriptionseigenschaften der RNS-Polymerase durch Translationsfaktoren beeinflußt werden, sondern auch die Synthese der entsprechenden Proteine aneinander gekoppelt ist, d.h. reguliert ist.

Bevor die vorliegende Arbeit begonnen wurde, war bekannt, daß Aminosäuremangel bei Escherichia coli zu einem synchronen Stop von rRNS und Proteinsynthese führt, hervorgerufen durch die ribosomale Synthese von β', β' -Guanosin-Tetraphosphat (47), d.h. über den Umweg Ribosom wird in diesem Fall die Aktivität von RNS-Polymerase, rRNS zu synthetisieren, beeinflußt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun, daß der Tetrahydrofolat-Zyklus, über die Formylierung von Initiator tRNS, mRNA und Protein Synthese miteinander verbindet. Tetrahydrofolat ist somit nicht nur Schaltstation zur DNS-Synthese oder zur Synthese

von Histidin und Methionin, sondern auch zur Transkription und Translation, wie aus Abb. 7 zu ersehen ist. Von den vielen Fragen, die die Befunde der vorliegenden Arbeit neu eröffnen bzw. offen lassen, mußte vor allem eine unbeantwortet bleiben, nämlich inwieweit Initiator tRNS ein genereller Aktivator von RNS-Polymerase Promotoren ist oder aber lediglich die Transkription spezieller Gene aktiviert, zu denen das β -Galaktosidase-Gen gehören würde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, daß eine Wechselwirkung zwischen Initiator tRNS und RNS-Polymerase in Escherichia coli besteht, die eine bisher noch nicht gefundene Koppelung der zellulären Translationsebene an die Transkription von E. coli DNS darstellt.

Sowohl mit Chromosomen als auch mit Ribosomen von Escherichia coli ist die DNS-abhängige RNS-Polymerase assoziiert. Umgekehrt ist eine Bindung der Initiator tRNS nicht nur an Ribosomen, sondern auch an Escherichia coli Chromosomen nachgewiesen worden. Initiator tRNS und RNS-Polymerase bilden einen spezifischen Komplex untereinander, der durch den Sigma-Faktor stimuliert wird. Abdissoziation des Sigma-Faktors von RNS-Polymerase führt zu einer starken Abnahme der Initiator tRNS Bindung an RNS-Polymerase. Die Bindung von Initiator tRNS an RNS-Polymerase stimuliert die Initiation der Transkription von Genen, die für mRNS codieren. Auf die Synthese von stabiler RNS hat die Initiator tRNS keinen Einfluß. Das chemisch reaktive Initiator tRNS Analoge, BrAcMet-tRNS_f^{Met}, reagiert irreversibel mit der β, β' -Untereinheit der RNS-Polymerase, die somit einen Bindungsort der Initiator tRNS darstellen.

6. LITERATUR

- (1) JACOB, F. & Monod, J. (1961)
"Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins", J. Mol. Biol. 3, 318 - 356.
- (2) JACOB, F. & Monod, J. (1961)
"On the regulation of gene activity", Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 26, 193-211.
- (3) GILBERT, W. & Müller-Hill, B. (1967)
"The lac operator is DNA", Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 2415-2421.
- (4) RIGGS, A.D., Bourgeois, S., Newby, R.F. & Cohn, M. (1968)
"DNA binding of the lac repressor", J. Mol. Biol. 34, 365-368.
- (5) ZUBAY, G. & Lederman, M. (1969)
"DNA-directed peptide synthesis. IV. Regulating the expression of the lac operon in a cell-free system", Proc. Nat. Acad. Sci. 62, 550-557.
- (6) MONOD, J. (1947)
"The phenomenon of enzymatic adaption", Growth 11, 223-289.
- (7) NAKADA, D. & Magasanik, B. (1964)
"The roles of inducer and catabolite repressor in the synthesis of β -galactosidase by Escherichia coli", J. Mol. Biol. 8, 105-127.
- (8) TYLER, B. & Magasanik, B. (1969)
"Molecular basis of transient repression of β -galactosidase in Escherichia coli", J. Bact. 97, 550-556.

- (9) JACQUET, M. & Repes, A. (1969)
"The step sensitive to catabolite repression and its reversal by 3'-5' cyclic AMP during induced synthesis of β -galactosidase in *E. coli*",
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 84-92.
- (10) MAALOE, O. & Kjeldgaard, N.O. (1966)
"Control of macromolecular synthesis", W.A. Benjamin, New York.
- (11) TRAVERS, Andrew (1973)
"Control of Ribosomal RNA Synthesis in vitro",
Nature 244, 15-17.
- (12) LINDAHL, L., Jaskunas, S.R., Dennis, P.P. & Nomura, M. (1975)
"Cluster of genes in *Escherichia coli* for ribosomal proteins, ribosomal RNA, and RNA polymerase subunits",
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2743-2747.
- (13) CHAKRABARTI, S.L. & Gorini, L. (1975)
"A link between streptomycin and rifampicin mutation", *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2084-2087.
- (13a) KURLAND, C.G. (1971)
"Purification of Ribosomes from *Escherichia coli*",
Methods in Enzymology 20, 379-380 (Moldave, K. & Grossman, L., eds.) Academic Press, New York.
- (14) GESTELAND, R.F. (1966)
"Isolation and characterization of ribonuclease I mutants of *E. coli*", *J. Mol. Biol.* 16, 67-84.
- (15) DUBNOFF, J.S. & Maitra, U. (1971)
"Isolation and Properties of Protein Factors Involved in Polypeptide Chain Initiation in *Escherichia coli*", *Methods in Enzymology* 20, 248-261
(Moldave, K. & Grossman, L., eds.) Academic Press, New York

- (16) TRAUB, P. & Zillig, W. (1966)
"Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine.
VI. Eine neue Methode zur Darstellung eines zell-
freien Systems aus *Escherichia coli* und deren
Eigenschaften in der nucleinsäurenabhängigen
Proteinsynthese", *Hoppe Seyler's Zeitschrift für
physiologische Chemie* 343, 246-260.
- (17) NISHIMURA, S., Narada, F., Narushima, U. &
Seno, T. (1967)
"Purification of Methionine-, Valine-, Phenyl-
alanine- and Tyrosine Specific tRNA from
Escherichia coli", *Biochem. Biophys. Acta* 142,
133-148.
- (18) HERSHEY, J.W.B. & Thach, R.E. (1967)
"Role of Guanosine 5'-Triphosphate in the Initiation
of Peptide Synthesis. I. Synthesis of Formylmethionyl-
Puromycin", *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 759-766.
- (19) BURGESS, R. (1969)
"A New Method for the Large Scale Purification
of *Escherichia coli* Deoxyribonucleic Acid-dependent
Ribonucleic Acid Polymerase", *J. Biol. Chem.* 244,
6160-6167.
- (20) SCHALLER, H., Nüsslein, C., Bonhoeffer, F.J.,
Kurz, C. & Nietzsche, I. (1972)
"Affinity Chromatography of DNA-Binding Enzymes
on Single-Stranded DNA-Agarose Columns", *Eur. J.
Biochem.* 26, 474-481.
- (21) STCNINGTON, G.G. & Pettijohn, D.E. (1970)
"The folded Genome of *Escherichia coli* Isolated
in a Protein-DNA-RNA Complex", *Proc. Nat. Acad.
Sci. U.S.* 66, 6-9.

- (22) WORCEL, A. & Burgi, E. (1972)
"On the Structure of the Folded Chromosome of *Escherichia coli*", J. Mol. Biol. 71, 127-147.

- (23) KORNBERG, T., Lockwood, A. & Worcel, A. (1974)
"Replication of the *Escherichia coli* Chromosome with a Soluble Enzyme System", Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 3189-3193.

- (24) SHAPIRO, J., Machattie, L., Eron, L., Ihler, G., Ippen, K. & Beckwith, J. (1974)
"Isolation of Pure lac Operon DNA", Nature 224, 768,

- (25) MILLER, J.H. (1972)
"Cell-free Synthesis of β -galactosidase", Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York).

- (26) ZUBAY, G., Chambers, D.A. & Cheong, L.C. (1970)
"Cell-free Studies on the Regulation of the lac-operon", In: Beckwith, J.R. & Zipser, D. (eds.), The Lactose Operon, p. 375-391, Cold Spring Harbor Laboratory.

- (27) BOLTEN, A.E. & Hunter, W.M. (1973)
"The Labelling of Proteins to High Specific Radioactivities by Conjugation to a ¹²⁵J-Containing Acylating Agent", Biochem. J. 133, 329-339.

- (28) MARMUR, J. (1961)
"A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms", J. Mol. Biol. 3, 208-218.

- (29) KURLAND, C.G., Hardy, S.J.S. & Mora, G. (1971)
"Purification of Ribosomal Proteins from
Escherichia coli", Methods in Enzymology 20,
381-391 (Moldave, K. & Grossmann, L., eds.)
Academic Press, New York.

- (30) KALTSCHMIDT, E. & Wittmann, H.G. (1970)
"Two-dimensional polyacrylamide gel electro-
phoresis for fingerprinting of ribosomal
proteins", Anal. Biochem. 36, 401-412.

- (31) STUDIER, F.W. (1973)
"Analysis of Bacteriophage T7 Early RNA's and
Proteins on Slab Gels", J. Mol. Biol. 79,
237-248.

- (32) BRIMACOMBE, R., Morgan, J.M. & Cox, R.A. (1971)
"An Improved Technique for the Analysis of Ribo-
nucleoprotein Fragments from Escherichia coli 30S
Ribosomes", Eur. J. Biochem. 23, 52-60.

- (33) BONNER, W.M. & Laskey, R.A. (1974)
"A Film Detection Method for Tritium-Labelled
Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide-
Gels", Eur. J. Biochem. 46, 83-88.

- (34) NIRENBERG, M.W. & Mathaei, J.H. (1961)
"The Dependence of Cell-Free Protein Synthesis
in E. coli upon Naturally Occurring or Synthetic
Polyribonucleotides", Proc. Nat. Acad. Sci. 47,
1588-1602.

- (35) BRETSCHER, M.S. & Marcker, K.A. (1966)
"Polypeptidyl-s Ribonucleic Acid and Amino-Acyl-s
Ribonucleic Acid Binding Sites on Ribosomes",
Nature 211, 380-384.

- (36) PARMEGGIANI, A., Singer, C. & Gottschalk, E.M. (1971)
"Purification of the Amino Acid Polymerization Factors from *Escherichia coli*",
In: *Methods in Enzymology* 20, 291-302 (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.), Academic Press, New York.
- (37) NISHIZUKA, Y., Lipmann, F. & Lucas-Lenard, I. (1968)
"Isolation and properties of *Escherichia coli* amino acid polymerizing enzymes", *Methods in Enzymology* XII, Part 3, 708
- (38) ALLENDE, I.E., Monro, R. & Lipmann, F. (1964)
"Resolution of the *E. coli* aminoacyl sRNA transfer-factor into two complementary fractions", *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 51, 1211
- (39) TRAVERS, A., Kamen, R. & Cashel, M. (1970)
"The in vitro Synthesis of Ribosomal RNA", *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 415
- (40) TRAVERS, A. & Buckland, R. (1973)
"Heterogeneity of *E. coli* RNA Polymerase", *Nature* 243, 257-260
- (41) STÖFFLER, G. & Wittmann, H.G. (1971)
"Sequence differences of *Escherichia coli* 30S ribosomal proteins as determined by immuno-chemical methods", *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68, 2283.
- (42) STÖFFLER, G. et al. (1971)
"Ribosomal proteins. XIX. Altered S5 ribosomal protein in *Escherichia coli* revertant from streptomycin dependence to independence", *Mol. Gen. Genet.* 111, 334

- (43) GIORNO, R., Stamato, T., Lydersen, B. & Pettijohn, D. (1975)
"Transkription in vitro of DNA in Isolated Bacterial Nucleotides", J. Mol. Biol. 96, 217-237.
- (44) KORNBERG, T. & Getter, M.L. (1971)
"Purification and DNA Synthesis in Cell-Free Extracts: Properties of DNA Polymerase II", Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 761-764
- (45) DANCHIN, A. (1973)
"Does Formylation of Initiator tRNA act as a Regulatory Signal in E. coli?" FEBS Letters 34, 327-331.
- (46) SAMUEL, C.E., D'Arie, L. & Rabinowitz, J.C. (1970)
"Evidence against the folate-mediated formylation of formyl-accepting methionyl transfer ribonucleic acid in Streptococcus faecalis R", J. Biol. Chem. 245, 5115-5121.
- (47) HASELTINE, W.A. (1972)
"In vitro Transcription of Escherichia coli Ribosomal RNA Genes", Nature 235, 329-333.

LEBENS LAUF

- 1948 geboren in Berlin
- 1955 - 1961 Besuch der Herrmann-Boddin-Grundschule
in Berlin-Neukölln
- 1961 - 1963 Besuch der Kurt-Löwenstein-Oberschule
in Berlin-Neukölln
- 1963 - 1969 Besuch der Ernst-Abbe-Oberschule in
Berlin-Neukölln
- 1969 Abitur
Beginn des Studiums der Biologie mit der
Fachrichtung Allgemeine Biologie und
Genetik an der Freien Universität Berlin
- 1970 Fachrichtungswechsel zur Biochemie und
Biophysik
- 1971 Vorprüfung zur Diplomprüfung im
Fachbereich Biologie
- 1972 Beginn der Diplomarbeit unter Leitung von
Dr. K. Nierhaus und Prof. H.-G. Wittmann
am Max-Planck-Institut für Molekulare
Genetik in Berlin
- 1974 Abgabe der Diplomarbeit und Diplomprüfung
im Fachbereich Biologie
- 1973 Beginn der Doktorarbeit unter Leitung von
Priv. Doz. Dr. G. Pongs am Max-Planck-
Institut für Molekulare Genetik in Berlin

